



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 19 136.3

**Anmeldetag:** 18. April 2000

**Anmelder/Inhaber:** Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am  
Main/DE

**Bezeichnung:** Polyamidnukleinsäure-Derivate, Mittel und Verfahren  
zu ihrer Herstellung

**IPC:** C 07 K, A 61 K, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. November 2000  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Ebert

5

Polyamidnukleinsäure-Derivate, Mittel und Verfahren zur ihrer Herstellung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf N-terminal phosphorylierte Polyamidnukleinsäure-(PNA)-Derivate mit verbesserten Eigenschaften, deren  
10 Verwendung, sowie Mittel und Verfahren zu ihrer Herstellung.

Polyamidnukleinsäuren, auch Peptidnukleinsäuren (PNA) genannt, binden mit höherer Affinität als natürliche Oligonucleotide an komplementäre Zielsequenzen (DNA oder RNA) und haben gegenüber natürlicher DNA zudem  
15 den Vorteil, daß sie im Serum sehr stabil sind. PNA waren ursprünglich beschrieben als unnatürliche Nukleinsäure-Analoga, in denen das gesamte Zucker-Phosphat-Rückgrat durch N-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheiten ersetzt ist (M. Egholm et al. (1991) Science 254, 1497-1500; WO 92/20702; M. Egholm et al. Nature (1993) 365, 566-568; P. Nielsen, (1994) Bioconjugate Chem. 5, 3-7;  
20 E. Uhlmann et al. (1998) Angewandte Chemie Int. Ed. Engl. 37, 2796-2823). Als Basen werden die in der Nucleotidchemie üblichen natürlich vorkommenden oder auch nicht natürlich vorkommenden Nucleobasen oder deren Prodrugformen benutzt, also Vorstufen, die erst im Organismus durch Biotransformation in die freie Base überführt werden. Darüberhinaus wurden  
25 PNAs beschrieben, in denen nicht alle Positionen des Rückgrates Basenreste tragen (Greiner et al. (1999) Helv. Chim Acta 82, 2151), und in denen Aminoethyl-glycin durch komplexere Einheiten ersetzt ist (Uhlmann et al. (1998) Angewandte Chem. Int. Ed. 37, 2796; Falkiewicz (1999) Biochim. Pol., 46, 509-529).

30 Der ladungsneutrale Charakter des PNA-Rückgrats ist ein wichtiges Merkmal dieser Substanzklasse mit weitreichenden Konsequenzen. Es wird dem neutralen Charakter der PNA und der damit verbundenen verringerten Ladungsabstossung zugeschrieben, dass PNA selbst bei niedriger

Salzkonzentration an komplementäre DNA und RNA bindet (z.B. Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999, 3), wobei die Watson-Crick-Basenpaarungsregeln befolgt werden. Daher kann PNA im Prinzip für

5 zahlreiche Anwendungen herangezogen werden, in denen sonst natürliche Oligonucleotide bzw. Oligonucleotid-Derivate eingesetzt werden. Darüber hinaus ergeben sich aber aufgrund der einzigartigen Bindungseigenschaften auch zahlreiche Anwendungen, die mit natürlichen Oligonucleotiden nicht möglich sind (siehe zum Beispiel: Peptide Nucleic Acids: Protocols and

10 Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999). Beispielsweise ist mit PNA eine Stranginvasion an doppelsträngiger DNA beobachtet worden.

Typische Beispiele zur Anwendung von PNA beinhalten deren Verwendung zur

15 Inhibition der Genexpression durch sequenzspezifische Bindung an die zelluläre DNA oder RNA. „Antisense-Agenzien“ sind kurze einzelsträngige Nukleinsäure-Derivate, die über Watson-Crick Basenpaarung an eine komplementäre mRNA binden, deren Übersetzung in das entsprechende Protein gehemmt werden soll (Uhlmann und Peyman (1990) Chem. Rev. 90,

20 543; Larsen et al. (1999) Biochem. Biophys. Acta 1489, 159). "Anti-Gen-Agenzien" binden über Hoogsteen-Basenpaarung in die große Furche der DNA-Doppelhelix unter Ausbildung einer Tripelhelix, wodurch die Transkription der Gene sequenzspezifisch gehemmt wird (Praseuth et al. (1999) Biochem. Biophys. Acta 1489, 181). Die Genexpression kann auch durch sogenannte

25 "Decoy"-Oligomere, die die Bindungsregionen für Transkriptionsfaktoren nachahmen, spezifisch gehemmt werden. Durch die Behandlung mit Decoy-Agenzien lassen sich bestimmte Transkriptionsfaktoren sequenzspezifisch abfangen und dadurch eine Aktivierung der Transkription verhindern (Mischianti et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 33114). Eine weitere Gruppe von intrazellulär

30 wirkenden Oligonucleotid-Derivaten, die Chimeraplasten, werden zur gezielten

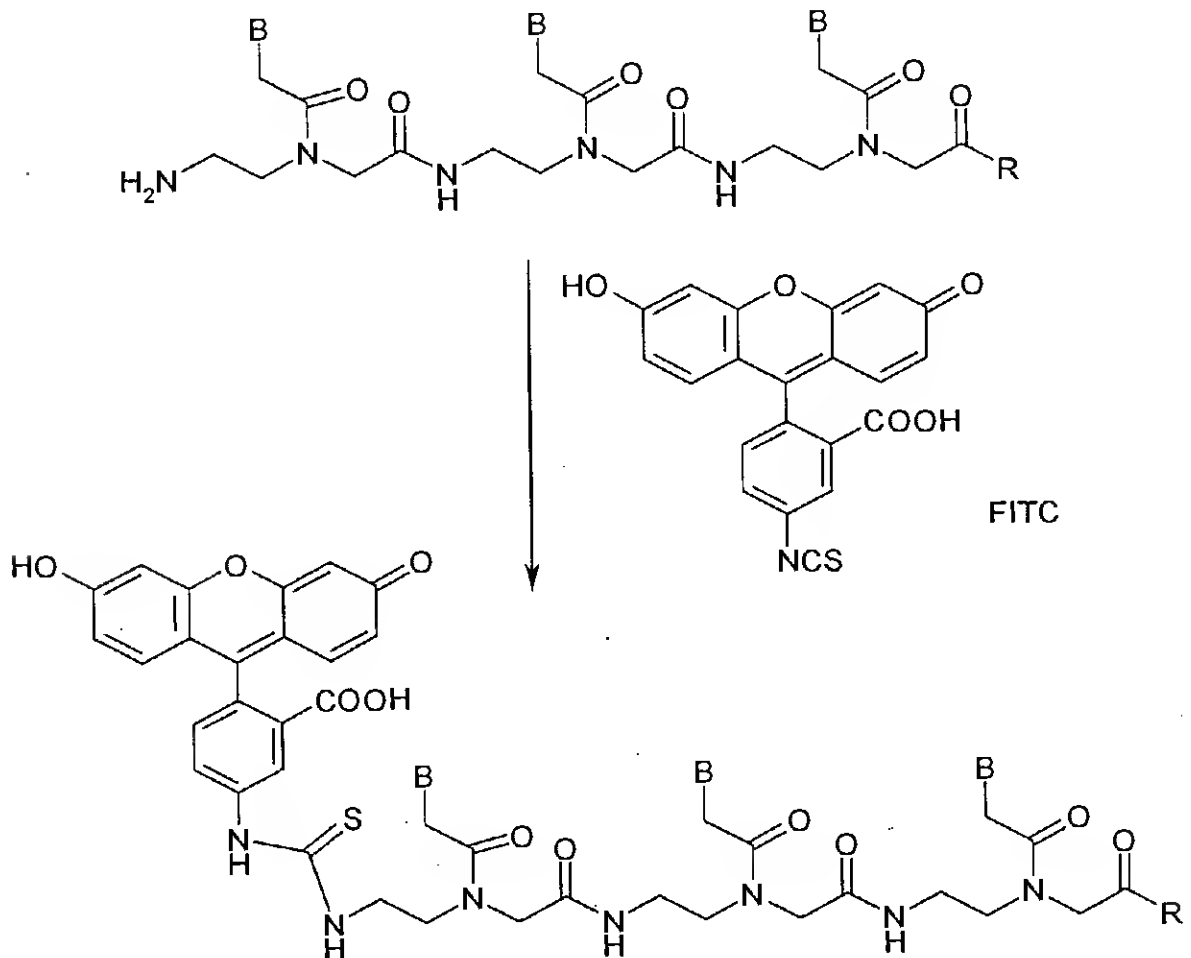
Genkorrektur herangezogen (Cole-Strauss et al. (1996) Science 273, 1386-1389).

- PNA können daher als Arzneimittel und/oder Diagnostikum bzw. zur
- 5 Herstellung von Arzneimitteln und/oder Diagnostika verwendet werden.

Für diagnostische Zwecke und in der Molekularbiologie kann PNA  
beipieelsweise nach Markierung mit Biotin, Fluorescein oder anderen Labeln als  
spezifische Hybridisierungssonde eingesetzt werden. Für die Einführung der  
10 Markergruppen sind in der Literatur bislang vier Methoden beschrieben (Oerum  
et al. (1999), in Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications, Seiten 81-  
86; Lohse et al. (1997) Bioconjugate Chem. 8, 503). Die erste Methode beruht  
auf der Markierung der freien (entschützten) PNA nach deren Synthese in  
Lösung. Dabei wird der Aminotermius der PNA mit einer aktivierten  
15 Carbonsäure oder einem Isothiocyanat umgesetzt. Oft werden aber zusätzliche  
Lysin-Reste in die PNA eingeführt, die dann mit Fluoresceinisothiocyanat  
(FITC) umgesetzt werden.

Bei der zweiten Methode wird die geschützte PNA noch an der Festphase am  
20 Aminotermius mit aktivierten Carbonsäure-Derivaten oder Isothiocyanaten  
modifiziert. Diese Methode eignet sich nur für Markergruppen, die unter den  
Bedingungen der Entschützung der PNA und während der Abspaltung vom  
Träger stabil sind. Als reaktive Reagenzien werden in beiden Fällen bevorzugt  
Isothiocyanate (P. Wittung et al., (1995) FEBS Lett. 375, 27) oder aktivierte  
25 Carbonsäuren, wie beispielsweise N-Hydroxysuccinimidester (NHS), eingesetzt  
(Oerum et al., 1999). Ein Nachteil der Reaktion mit den NHS-Derivaten ist,  
dass sie oft nur in schlechten Ausbeuten gelingt. Daher wird häufig 8-Amino-  
3,6-dioxaoctansäure als Linker bzw. Spacer zwischen PNA und Markergruppe  
kondensiert (Oerum et al., 1999). Beide Verknüpfungen erfolgen über  
30 Amidbindungen bzw. Thioharnstoffbindungen, die als solche aber eher zu  
Unlöslichkeit führen. Alternativ werden die Carbonsäuren mit Hilfe von in der

Peptid-Chemie üblichen Aktivatoren, wie beispielsweise HBTU, TBTU oder HATU zur Reaktion gebracht.



5

Bei einer dritten Methode werden Fluorescein-konjugierte Monomere bei der Festphasensynthese von PNA verwendet, wobei die Fluoreszenz-Markierung über eine Amidbindung erfolgt (Lohse et al. (1997) Bioconjugate Chem. 8, 503),  
 10 die wiederum zu relativ schwerlöslichen Konjugaten führt.

Eine vierte Methode verwendet PNA-Peptid-Konjugate, in denen der Peptid-Teil ein Substrat für eine Protein-Kinase bildet (Koch et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 6933). Auf diese Weise wird also nicht der PNA-Teil modifiziert, sondern

PNA-Teil



Es ist bekannt, dass PNA in wässriger Lösung, also auch unter physiologischen Bedingungen, zur Aggregation neigt. PNA ist daher in wässrigem Puffer schlecht löslich und steht dann nicht für die Hybridisierung an komplementäre Sequenzen zur Verfügung. PNA zeigt zudem eine hohe Affinität zu verschiedenen Materialien wie ®Sephadex (Fa. Pharmacia), ®Bond Elut (Fa. Varian), oder verschiedene HPLC-Chromatographiematerialien, die bei der

Aufreinigung der Oligomeren Verwendung finden, so daß die PNA oft nur in schlechten Ausbeuten zu isolieren ist. Daher ist es notwendig, die PNA mit Lysin oder anderen positiv geladenen Aminosäuren (über den C-Terminus) zu konjugieren (Egholm et al (1992) J. Am. Chem. Soc. 114, 1895). Guaninreiche PNA-Sequenzen tendieren ganz besonders zur Aggregation, weshalb von der Verwendung solcher PNA abgeraten wird (siehe "Guidelines for sequence design of PNA oligomers" in Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications (1999) Seiten 253-255). Besonders schwerlöslich sind beispielsweise längere Fluorescein-markierte PNA-Oligomere, wobei die Zugabe eines organischen Lösemittels und Erwärmen auf 50°C empfohlen wird.

Die Reinigung der schwerlöslichen lipophilen PNA-Derivate ist besonders schwierig. Bei der HPLC werden oft mehrere Peaks detektiert, die auf PNA-Aggregate zurückzuführen sind. Die für die Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren häufig angewandte Technik der Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese ist für diese PNA-Derivate nicht möglich.

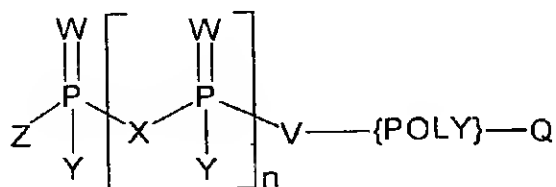
Bei den oben beschriebenen Methoden der Derivatisierung von PNA wird die Marker-Gruppe stets durch Knüpfung einer Amidbindung oder Thioamidbindung eingeführt, wobei relativ schwerlösliche PNA-Derivate gebildet werden. Insbesondere bei der Einführung lipophiler Reste, wie beispielsweise des Fluoresceins, entstehen schwerlösliche PNA-Derivate. Da die Markierungsreaktionen zudem oft in schlechten Ausbeuten verlaufen, besteht eine zu lösende Aufgabe darin, neue PNA-Derivate bereitzustellen, welche in hohen Ausbeuten herzustellen sein sollen und vorteilhaften Eigenschaften aufweisen, wie verbesserter Löslichkeit, verbessertem Bindungsverhalten, besserer zellulärer Aufnahme aufweisen sollen, und die zudem den Einsatz effektiver Reinigungsmethoden für die PNA-Oligomeren erlaubt.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Bereitstellung von PNA-Derivaten, die am N-Terminus des PNA-Rückgrates einen oder mehrere

Phosphoryl-Reste tragen, wobei neben Oxo- auch Thio- und Imino-Derivate umfasst sind, und wobei mindestens einer der Phosphoryl-Reste eine oder mehrere deprotonierbare Gruppen, vorzugsweise Hydroxy- oder Mercapto-Gruppen trägt. Die Phosphoryl-Reste sind über eine Sauerstoff-Phosphor, Schwefel-Phosphor oder eine Stickstoff-Phosphor-Bindung entweder direkt oder über einen Spacer mit dem PNA-Rückgrat verknüpft, wobei der Spacer beispielsweise ein Alkanoylamid, ein Poly(alkoxy)carboxamid oder eine Aminosäure sein kann, die gegebenenfalls am  $\alpha$ - oder  $\beta$ -C-Atom eine Seitenkette tragen, wobei diese Seitenkette keinen Phosphoryl-Rest tragen darf. Beispiele für Phosphoryl-Reste sind Phosphat, Phosphonat, Thiophosphat, Phosphoamidat oder substituierte Phosphoryl-Reste, wobei substituierte Phosphoryl-Reste gegebenenfalls eine oder mehrere Markergruppen, oder Gruppen zur Quervernetzung, oder Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, oder Gruppen, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigern, tragen

Unter Markergruppen (Labeln) versteht man dabei Gruppen, die eine qualitative oder quantitative Bewertung der chemischen oder biologischen Aktivität der PNA-Derivate erlauben, beispielsweise Biotin oder Fluoreszein. Unter Quervernetzung (Cross-Linking) versteht man die Ausbildung intra- bzw. intermolekularer Bindungen zwischen räumlich benachbarten Funktionalitäten. Eine Gruppe zur Quervernetzung ist beispielsweise die Psoralengruppe.

Die Erfindung betrifft vorzugsweise PNA-Derivate der Formel I,



Formel I



wobei

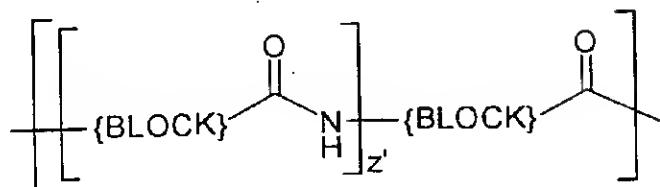
- V unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel,  $\text{NR}_1$ , eine Gruppe  $\text{U}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{\text{U}'}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}$  oder eine Gruppe  $\text{U}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{\text{U}'}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}$  ist,
- 5 U unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder NH ist,
- u' unabhängig voneinander gleich 1 bis 10 ist, vorzugsweise 1 bis 4, besonders bevorzugt 1,
- 10 W unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder  $\text{NR}_1$  ist,
- Y unabhängig voneinander gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion, Thioat oder  $\text{NR}_1\text{R}_2$  ist,
- 15  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  unabhängig voneinander einen Rest bestehend aus Wasserstoff oder  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -Alkyl bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,
- 20  $\text{R}_3$  und  $\text{R}_4$  unabhängig voneinander einen Rest bestehend aus Wasserstoff oder  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -Alkyl oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,
- X unabhängig voneinander gleich eine Gruppe  $\text{U}-(\text{C}_2\text{-C}_{22}\text{-Alkandiyl})-\text{U}$  oder eine Gruppe  $\text{U}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_{\text{U}'}-$  ist,
- 25 oder gleich eine Markergruppe, oder eine Gruppe zur Quervernetzung, oder eine Gruppe, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigt, oder eine Gruppe, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigert, ist, beispielsweise ein bifunktionseller Fluorescein-, Rhodamin-,

TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-, Adamantyl-, Vitamin E-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-, Psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- oder Digoxigenin-Rest,

- 5    Z    gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion, Thioat oder  $NR_1R_2$ ,  $C_1$ - $C_{22}$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_8$ -Arylalkyl,  $C_1$ - $C_{22}$ -Alkyl-U,  $C_1$ - $C_8$ -Arylalkyl-U, Hydroxy- $C_1$ - $C_{18}$ -U, Aminoalkyl-U, Mercaptoalkyl-U ist, oder eine Gruppe der Formel  $R_g(CH_2CH_2-O)_m$  ist, wobei  $R_g$  gleich Hydroxy, Amino oder  $C_1$ - $C_{22}$ -Alkoxy und  $m$  gleich 1 bis 100 ist,
- 10    vorzugsweise 2 bis 10, oder gleich eine Markergruppe, oder eine Gruppe zur Quervernetzung, oder eine Gruppe, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigt, oder eine Gruppe, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an Nukleinsäuren steigert, ist, beispielsweise ein monofunktioneller oder bifunktioneller
- 15    Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-, Adamantyl-, Vitamin E-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-, Psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- oder Digoxigenin-Rest,
- 20    n    gleich 0 bis 10 ist, vorzugsweise 0 bis 3,
- Q    gleich Hydroxy, Amino,  $NHR_7$ ,  $NR_7R_8$ , Aminosäure-Derivat oder ein Peptid-Rest ist,
- 25     $R_7$  und  $R_8$     unabhängig voneinander  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl oder Hydroxy- $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl sind,

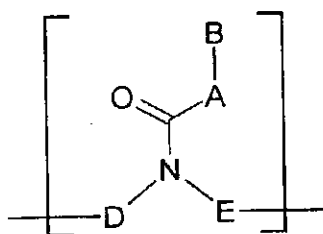
mit der Maßgabe, dass mindestens ein Rest Y oder Z gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion oder Thioat ist.

{POLY} wird beschrieben durch die Formel II.



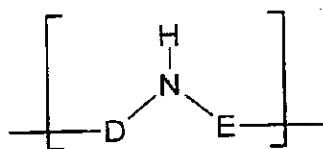
Formel II

- 5 Das PNA-Rückgrat ist damit aus  $z'+1$  Monomeren aufgebaut, wobei {BLOCK} unabhängig voneinander eine Gruppe ist ausgewählt aus Formel IIIA,



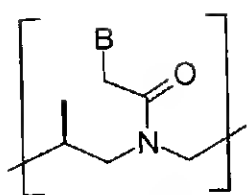
Formel IIIA

- 10 oder aus Formel IIIB (Greiner et al. (1999) Helv. Chim Acta 82, 2151),

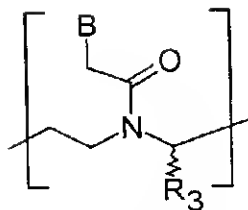


Formel IIIB

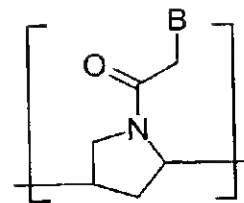
- 15 oder aus den Formeln IV A bis IV G (Uhlmann et al. (1998) Angewandte Chem. Int. Ed. 37, 2796; Falkiewicz (1999) Biochim. Pol., 46, 509-529),



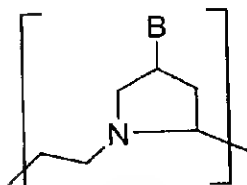
Formel IV A



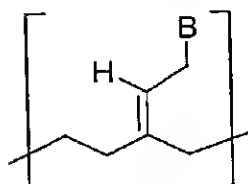
Formel IV B



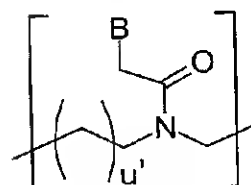
Formel IV C



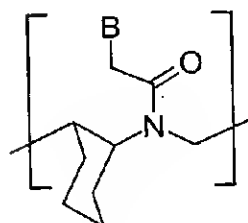
Formel IV D



Formel IV E



Formel IV F



Formel IV G

wobei jeder Baustein {BLOCK} verschieden sein kann,

und wobei

5

A unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_1R_2)_s$  ist, wobei s gleich 1 bis 3 ist, vorzugsweise 1,

10

B unabhängig voneinander entweder ein aromatischer Rest, der auch heteroaromatischen Charakter besitzen kann, oder Wasserstoff, oder Hydroxy oder  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl ist,  
oder eine in der Nucleotidchemie übliche natürlich vorkommende oder eine nicht natürlich vorkommende Nucleobase oder deren Prodrugform ist,

15

wobei mindestens ein Rest B in Formel II eine Nucleobase ist,

D unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_3R_4)_t$  ist, wobei  $t$  gleich 2 bis 10 ist, vorzugsweise 2 bis 4, besonders bevorzugt 2, wobei  $R_3$  und  $R_4$  die oben genannte Bedeutung haben, und zwei benachbarte Reste D auch einen C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylring bilden können,

5

E. unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_5R_6)_{z'}$  ist, wobei zwei benachbarte Reste  $R_5$  und  $R_6$  auch einen C<sub>5</sub>- bis C<sub>8</sub>-Cycloalkyl-Ring oder eine Spiroverbindung bilden können,

10  $R_5$  und  $R_6$  unabhängig voneinander einen Rest bestehend aus Wasserstoff oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl sind, vorzugsweise Wasserstoff, oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten,

$z'$  gleich 0 bis 100 ist, vorzugsweise 1-20, besonders bevorzugt 4-15.

15

Die Erfindung betrifft darüberhinaus physiologisch verträglichen Salze der PNA-Derivate der Formel I. Physiologisch verträglichen Salze sind u.a. beschrieben in Remingtons Pharmaceutical Science (1985) Mack Publishing Company, Easton, PA, USA, Seite 1418. Bevorzugt sind Ammoniumsalze, Trialkyl-  
20 ammoniumsalze, Alkalimetallsalze (wie Natrium- und Kaliumsalze) und Erdalkalisalze (wie Magnesium- und Calciumsalze). Besonders bevorzugt sind Natriumsalze.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass bereits eine negative Teilladung  
25 am Phosphoryl-Rest ausreicht, um die Eigenschaften der Verbindungen der Formel I entscheidend zu verbessern. Während PNA selbst bei der PAA-Gelelektrophorese nicht wandert, wandern die Verbindungen der Formel I zur Anode. Da der Phosphoryl-Rest während der Synthese der Verbindungen der Formel I erst im letzten Zyklus eingeführt wird, wandern bei der PAA-Gel-  
30 elektrophorese nur die erfindungsgemäßen Verbindungen im elektrischen Feld,

während alle Fehlsequenzen und Nebenprodukte nicht wandern und somit auf extrem einfache Art abgetrennt werden können.

- Die Hydroxy- bzw. Mercapto-Substituenten der Phosphoryl-Reste der erfindungsgemässen PNA-Derivate können in einem pH-Bereich von 4,5 bis 14, vorzugsweise 6,5 bis 12, besonders bevorzugt 6,5 bis 9 deprotoniert werden. Die Eigenschaft der Ionisierbarkeit der Phosphoryl-Reste kann vorteilhaft zur Reinigung der Verbindungen der Formel I ausgenutzt werden. Einerseits können die Verbindungen der Formel I durch Elektrophorese, beispielsweise Polyacrylamid-Gelelektrophorese, gereinigt werden. Andererseits ist eine Reinigung mit Hilfe von Anionenaustauschern möglich. Dabei werden die gewünschten Produkte bevorzugt durch Anwendung eines Salzgradienten, beispielsweise eines Kochsalz-Gradienten, oder eines pH-Gradienten eluiert. Besonders einfach und effizient lassen sich die erfindungsgemässen PNA-Derivate der Formel I über Anionenaustauscher reinigen. Es zeigte sich, dass die ungeladenen Nebenprodukte nicht auf dem Anionenaustauscher retardiert werden, während das geladene Produkt auf der Säule haftete. Nach Waschen mit Wasser konnte das gewünschte Produkt mit Essigsäure oder einer Kochsalzlösung in reiner Form isoliert werden. Als Anionenaustauscher verwendet man bevorzugt starke Anionenaustauscher, oder Mixed-Mode-Phasen, wie beispielsweise ©Oasis MAX (Waters GmbH, Eschborn).

- Weiterhin zeigte sich, dass die erfindungsgemässen Verbindungen der Formel I generell besser in wässrigem Medium löslich sind als die entsprechenden PNA-Oligomeren ohne den Phosphoryl-Rest. Dies macht sich ganz besonders bei den lipophilen Derivaten, wie beispielsweise den Fluorescein-Derivaten oder Hexadecyl-Derivaten, in Form einer stark verbesserten Löslichkeit in wässrigem Medium bemerkbar.

- Als weiterer überraschender positiver Effekt zeigte sich, dass die Einführung eines Phosphoryl-Restes beispielsweise als Phosphat oder auch in Form einer

lipophilen Derivatisierung (z. B. als Hexadecylphosphodiester) die Affinität der PNA an komplementäre DNA oder RNA erhöht. Dieser Effekt war nicht zu erwarten, da die starke Binding von PNA an komplementäre DNA oder RNA dem neutralen Charakter der PNA und der damit verbundenen reduzierten

- 5 Ladungsabstossung zugeschrieben wurde (z.B. Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999, 3).

- 10 Besonders effektiv erfolgte die Einführung des Biotins über einen Phosphoryl-Rest. Die biotinylierte PNA der Formel I (X und/oder Z = Biotinrest) zeigten als Hybridisierungssonden bessere Bindungseigenschaften und weniger störende unspezifische Hintergrund-Effekte als entsprechende biotinylierte DNA-Sonden.

- 15 Im Gegensatz zur ungeladenen PNA können die erfindungsgemäßen PNA-Derivate der Formel I auch im elektrischen Feld wandern, wodurch eine Mikrolokalisierung und eine Konzentrierung an immobilisierten komplementären Nukleinsäurederivaten möglich ist. Für die polyanionischen Oligonucleotide wurde diese Methode zur raschen Bestimmung von Basenmisspaarungen mit Hilfe des elektrischen Felds bereits beschrieben (Sosnowski et al. (1997) Proc.
- 20 Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 1119).

- Die Erfindung betrifft besonders PNA-Derivate, in denen A und E gleich  $\text{CH}_2$  sind. Weiterhin betrifft die Erfindung besonders PNA-Derivate, in denen D gleich  $(\text{CH}_2)_2$  sind. Bevorzugt sind ferner PNA-Derivate der Formel I, in denen
- 25 V, W und Y gleich Sauerstoff sind.

- Beispiele für natürliche Basen sind Adenin, Cytosin, 5-Methylcytosin, Guanin, Thymin und Uracil. Beispiele für unnatürliche Basen sind Purin, 2,6-Diaminopurin,  $\text{N}^4\text{N}^4$ -Ethanocytosin,  $\text{N}^6\text{N}^6$ -Ethano-2,6-diaminopurin, 5-( $\text{C}_3$ -
- 30  $\text{C}_6$ )-Alkynyl-uracil, 5-( $\text{C}_3$ - $\text{C}_6$ )-Alkynyl-cytosin, 5-(1-Propargylamino)-uracil, 5-(1-

Propargylamino)-cytosin, Phenoxazin, 9-Aminoethoxyphenoxazin, 5-Fluor-uracil oder Pseudoisocytosin, 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, 8-Azapurin, oder 7-Deaza-7-substituierte Purine.

Q ist bevorzugt ein Hydroxyalkylamino-Rest, insbesondere ein Hydroxyhexylamino-Rest, oder ein Derivat einer bekannten natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure oder eines Peptids. Als Peptidsequenzen kommen bevorzugt solche in Betracht, die Organverteilung oder die zelluläre Lokalisierung des PNA optimieren, wie beispielsweise Transportin, Insulin-like Growth Factor, Nuclear Localisation Signale oder andere Carriersequenzen (Larsen et al. (1999) Biochim. Biophys. Acta 159-166). Das Peptid kann auch als Affinitäts-Tag dienen, wie etwa eine (His)<sub>6</sub> Kette.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht eine breite Variation der Reste X und Z (Beispiele sind in Figuren 1a, 1b, 2a, 2b, 3a und 3b gegeben) und erlaubt so die Einführung unterschiedlicher spezifischer Funktionsmerkmale in PNA.

20

Eine bevorzugte Ausführungsform von Z ist ein C<sub>1</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkyl-Rest. Bevorzugt sind auch C<sub>1</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkoxy-Reste, insbesondere C<sub>16</sub>-Alkoxy-Reste. Andere bevorzugte Reste sind Hydroxy-(C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy)-Reste, insbesondere HO(CH<sub>2</sub>)<sub>3-12</sub>O. Weiterhin bevorzugt sind Aminoalkoxy-Reste, insbesondere 6-Aminohexoxy- und 5-Aminopentoxy-Reste. Weiterhin bevorzugt sind Reste der Formel R<sub>9</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>, wobei R<sub>9</sub> gleich Hydroxy, Amino oder C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkoxy ist, bevorzugt aber Hydroxy ist, und m gleich 0 bis 100, bevorzugt 2 bis 10 ist. Besonders bevorzugt sind HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>2</sub>,



$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_6$  und  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_2$ . Weitere bevorzugte Beispiele von Z umfassen Mercaptoalkoxy-Reste, insbesondere 6-Mercaptohexyloxy.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst Z eine fluoreszierende Gruppe wie Fluorescein, Rhodamin, TAMRA oder einen Cyanin-Farbstoff. Bevorzugte fluoreszierende Gruppen sind in den Figuren 1a bis 3b zu finden. Ganz besonders bevorzugt ist auch Biotin für Z. Andere bevorzugte Gruppen für Z umfassen Dabcyl, Psoralen, Acridin, DNP und Cholesterol (Figuren 1b und 2b), BODIPY-, ROX- oder R6G-Reste (Su-Chun Hung et al. (1998) Analytical Biochemistry 255, 32-38) und Digoxigenin (Tarrason et al., Methods in Enzymology (1999) Vol. 313, 257-268). Darüberhinaus kann Z gleich einer Gruppe bestehend aus einem monofunktionellen oder einem bifunktionellen Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Cholesteryl-, Acridin-, Adamantyl-, Vitamin-E-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Edans-, Lexitropsin-, oder Psoralen-Rest sein. Monofunktionelle Endgruppen sind beispielhaft in den Figuren 1a, 1b, 2a und 3a ausgeführt, bifunktionelle verbrückende Gruppen sind in Figuren 2b und 3b aufgeführt. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist n gleich 0, d.h. der PNA-Teil trägt nur einen Phosphat- oder Phosphorylrest.

20

Eine bevorzugte Ausführungsform von X ist  $\text{U}(\text{C}_2\text{-C}_{22}\text{-Alkandiy})\text{-U}$ ,

insbesondere  $\text{O}(\text{C}_2\text{-C}_{22}\text{-Alkandiy})\text{-O}$ , besonders bevorzugt  $\text{O}(\text{CH}_2)_{2-6}\text{-O}$ .

Eine andere bevorzugte Ausführungsform von X ist eine Gruppe der Formel

$\text{U}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_{u'}\text{-U}$  ist, wobei  $u'$  gleich 1 bis 10 ist, bevorzugt 1 bis 6, und wobei U

25

bevorzugt Oxy ist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst X eine fluoreszierende Gruppe wie Fluorescein, Rhodamin, TAMRA oder einen Cyanin-Farbstoff, beispielsweise Cy3 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Bevorzugte bifunktionelle Gruppen sind in den Figuren 2a und 3a zu finden. Ganz besonders bevorzugt ist auch Biotin für X. Andere bevorzugte Gruppen

für X umfassen Dabcyl-, Psoralen-, Acridin-, DNP-, Cholesterol-, BODIPY-, Digoxigenin-, ROX- und R6G-Reste.

Die unterschiedlichen Reste für X und Z in Formel I können unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die Fluorescein-Reste haben weitreichende Anwendungen bei der DNA-Sequenzierung, Signalamplifikation oder als Marker zur Bestimmung der zellulären Aufnahme von PNA. Die Cyanin-Farbstoff-Reste (Cy3 und Cy5) ergeben ein wesentlich intensiveres und länger anhaltendes Fluoreszenzsignal als Fluorescein selbst. Der Psoralen-Rest wird zur Quervernetzung (Cross-Linking) mit komplementären Nukleinsäuren eingesetzt. Der Acridin-Rest ist ein effektiver Interkalator und kann damit die Bindungsaffinität der PNA verstärken. Biotin-, Acridin- und Psoralen-Derivate können auch für Antisense-Experimente eingesetzt werden. Weiterhin können Hexadecyloxy- und Cholesterol-Derivate zur Erhöhung der Membrangängigkeit der PNA angewandt werden. DNP-markierte Verbindungen der Formel I lassen sich mit anti-DNP-Antikörpern nachweisen. Aminoalkoxy-Reste lassen sich zur Kupplung weiterer Gruppen, wie beispielsweise Lexitropsin (vgl. Beispiel 17; PNA-16), nutzen. In ähnlicher Weise lassen sich auch Mercaptoalkoxy-Gruppen zur weiteren Derivatisierung nutzen.

20

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der PNA-Derivate der Formel I als Arzneimittel. Diese Arzneimittel können zur Prävention und/oder Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden, die mit der Expression bzw. einer Überexpression bestimmter Gene einhergehen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von PNA-Derivaten der Formel I als Diagnostikum. Diese Diagnostika können zur Früherkennung der oben genannten Krankheiten eingesetzt werden.

25

Als Arzneimittel bzw. Diagnostikum lassen sich die PNA-Derivate der Formel I in Abhängigkeit ihrer Sequenz als Antisense-, Antigene-, Decoy-, und Chimeraplast-Agenzien nutzen.

30

Die erfindungsgemäßen PNA-Derivate werden insbesondere zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krankheiten verwendet, bei denen definierte Gene durch Überexpression ursächlich bzw. beteiligt ist.

5 Diese Arzneimittel können beispielsweise zur Behandlung von Erkrankungen verwendet werden, die durch Viren hervorgerufen werden, beispielsweise durch CMV, HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder Papilloma Viren, wobei die entsprechende Virus-Sequenz das Target ist.

10 Erfindungsgemäße Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basensequenz.

a) gegen CMV, z. B.

15 SEQ ID NO. 1 5'-G C G T T T G C T C T T C T T C T T G C G-3'

b) gegen HIV, z. B.

SEQ ID NO. 2 5'-A C A C C C A A T T C T G A A A A T G G -3'

20 SEQ ID NO. 3 5'-A G G T C C C T G T T C G G G C G C C A-3'

c) gegen HSV-1, z.B.

SEQ ID NO. 4 5'-G C G G G G C T C C A T G G G G G T C G-3'

25

Solche Arzneimittel eignen sich beispielsweise auch zur Behandlung von Krebs. Vorzugsweise können dabei Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Krebsentstehung bzw. Krebswachstum verantwortlich sind, insbesondere durch die Inhibition der Telomerase (E.

30 Matthes et al. (1999) Nucleic Acids Res. 27, 1152). Solche Targets sind weiterhin:

1) Nucleare Onkoproteine wie beispielsweise c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120,

2) Cytoplasmische/Membran-assoziierte Onkoproteine wie beispielsweise EJ-ras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl, c-ets,

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise EGF-Rezeptor, Her-2, c-erbA, VEGF-Rezeptor (KDR-1), Retinoid-Rezeptoren, Protein-Kinase regulatorische Untereinheit, c-fms, Tie-2, c-raf-1 Kinase, PKC-alpha, Protein Kinase A (R1 alpha),

4) Cytokine, Wachstumsfaktoren, Extrazelluläre Matrix wie beispielsweise CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, bFGF, VEGF, Myeloblastin, Fibronectin.

Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) gegen c-Ha-ras, z. B.

SEQ ID NO. 5	5'-CAGCTGCAACCCAGC-3'
SEQ ID NO. 6	5'-TATTCCGTCAT-3'
SEQ ID NO. 7	5'-TTCCGTCATCGCTCCTCAGGGG-3'

b) bFGF, z.B.

SEQ ID NO. 8	5'-GGCTGCCATGGTCCC-3'
--------------	-----------------------

c) c-myc, z.B.

SEQ ID NO. 9	5'-GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC-3'
--------------	-----------------------------

SEQ ID NO. 10 5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'

d) c-myb, z.B.

5 SEQ ID NO. 11 5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3'

e) c-fos, z.B.

SEQ ID NO. 12 5'-CGAGAACATCATCGTGG-3'

10 SEQ ID NO. 13 5'-GGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'

SEQ ID NO. 14 5'-CCCGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'

SEQ ID NO. 15 5'-GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG-3'

f) p120, z. B.

15

SEQ ID NO. 16 5'-CACCCGCCTTGGCCTCCAC-3'

g) EGF-Rezeptor, z.B.

20 SEQ ID NO. 17 5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3'

SEQ ID NO. 18 5'-GGCAAACCTTTCTTTTCCTCC-3'

h) p53 Tumorsuppressor, z.B.

25 SEQ ID NO. 19 5'-GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3'

SEQ ID NO. 20 5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3'

i) bcl-2, z. B.

SEQ ID NO. 21 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'

30

k) VEGF, z. B.



SEQ ID NO. 22 5'-G C G C T G A T A G A C A T C C A T G-3'  
SEQ ID NO. 23 5'-G G A G G C C C G A C C-3'  
SEQ ID NO. 24 5'-G G T T T C G G A G G C-3'  
SEQ ID NO. 25 5'-T G G T G G A G G T A G-3'  
5 SEQ ID NO. 26 5'-G C A T G G T G G A G G-3'  
SEQ ID NO. 27 5'-T T G G C A T G G T G G-3'  
SEQ ID NO. 28 5'-G C C T G G G A C C A C-3'  
SEQ ID NO. 29 5'-C A G C C T G G G A C C-3'  
SEQ ID NO. 30 5'-T G C A G C C T G G G A-3'  
10 SEQ ID NO. 31 5'-G T G C A G C C T G G G-3'  
SEQ ID NO. 32 5'-G G T G C A G C C T G G-3'  
SEQ ID NO. 33 5'-A T G G G T G C A G C C-3'  
SEQ ID NO. 34 5'-G G C T T G A A G A T G-3'  
SEQ ID NO. 35 5'-G C A G C C C C C G C A-3'  
15 SEQ ID NO. 36 5'-G C A G C A G C C C C C-3'

l) c-raf Kinase, z. B.

20 SEQ ID NO. 37 5'-T C C C G C C T G T G A C A T G C A T T-3'

m) PKC-alpha, z. B.

SEQ ID NO. 38 5'-G T T C T C G C T G G T G A G T T T C A-3'

25 n) Protein Kinase A, z. B.

SEQ ID NO. 39 5'-G C G T G C C T C C T C A C T G G C-3'

Arzneimittel enthaltend PNA-Derivate der Formel I eignen sich beispielsweise  
ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-  
30 Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden, beispielsweise durch VLA-4, VLA-2,  
ICAM, VCAM oder ELAM.

Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) VLA-4, z. B.

5

SEQ ID NO. 40     5'-G C A G T A A G C A T C C A T A T C -3'

b) ICAM-1, z. B.

10     SEQ ID NO. 41     5'-G C C C A A G C T G G C A T C C G T C A -3'

SEQ ID NO. 42     5'-C C C C C A C C A C T T C C C C T C T C -3'

SEQ ID NO. 43     5'-C T C C C C C A C C A C T T C C C C T C -3'

SEQ ID NO. 44     5'-G C T G G G A G C C A T A G C G A G G -3'

15     c) ELAM-1, z. B.

SEQ ID NO. 45     5'-A C T G C T G C C T C T T G T C T C A G G -3'

SEQ ID NO. 46     5'-C A A T C A A T G A C T T C A A G A G T T C -3'

20     d) Integrin alpha(V), z. B.

SEQ ID NO. 47     5'-G C G G C G G A A A G C C A T C G -3'

25     Arzneimittel enthaltend PNA-Derivate der Formel I eignen sich beispielsweise auch zur Verhinderung der Restenose. Dabei können PNA-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Proliferation oder Migration verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

30     1) Nucleare Transaktivator-Proteine und Cycline wie beispielsweise c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, Cycline und cdc2-Kinase

2) Mitogene oder Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF, bFGF, VEGF, EGF, HB-EGF und TGF- $\beta$ .

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise bFGF-Rezeptor, EGF-Rezeptor und  
5 PDGF-Rezeptor.

Antisense-PNA-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

10 a) c-myb, z. B.

SEQ ID NO. 48 5'-GTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'

b) c-myc, z. B.

15

SEQ ID NO. 49 5'-CAGTTGAGGGGCAT-3'

c) cdc2-Kinase, z. B.

20 SEQ ID NO. 50 5'-GTCTTCCATAGTTACTCA-3'

d) PCNA (proliferating cell nuclear antigen of rat), z. B.

SEQ ID NO. 51 5'-GATCAGGCGTGCCCTCAA-3'

25

PNA-Derivate können ebenfalls zur Behandlung von Vitiligo und anderen Depigmentierungskrankheiten bzw. Depigmentierungsstörungen (z.B. der Haut, Haare, Augen) wie beispielsweise Albinismus und Psoriasis verwendet werden, oder zur Behandlung von Asthma, wobei die Expression des Adenosin-A1-

30 Rezeptors, Adenosin-A3-Rezeptors, Bradikinin-Rezeptors oder von IL-13 mit



Hilfe geeigneter Antisense Agenzien inhibiert werden. Eine solche Basensequenz ist beispielsweise:

SEQ ID NO. 52      5'-G A T G G A G G G C G G C A T G G C G G G-3'

5

- Arzneimittel enthaltend ein PNA-Derivat der Formel I können z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten, die man oral, z.B. in Form von Tabletten, Dragees, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Lösungen; Emulsionen oder Suspensionen verabreichen kann, verwendet werden. Sie können auch rektal
- 10 z.B. in Form von Suppositorien oder parenteral z.B. in Form von Injektionslösungen verabreicht werden. Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können diese Verbindungen in therapeutisch inerten organischen und anorganischen Trägern verarbeitet werden. Beispiele von solchen Trägern für Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln sind
- 15 Laktose, Maisstärke oder Derivate davon, Talg und Stearinsäure oder Salze davon. Geeignete Träger für die Herstellung von Lösungen sind Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose. Geeignete Träger für Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerol und pflanzliche Öle. Geeignete Träger für Suppositorien sind pflanzliche und gehärtete Öle,
- 20 Wachse, Fette und halbflüssige Polyole. Die pharmazeutischen Präparate können auch Konservierungsmittel, Lösemittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgatoren, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksmittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Überzugsmittel, Antioxidantien, sowie ggf. andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.
- 25 Bevorzugte Verabreichungsformen sind topische Applikationen, lokale Applikationen wie beispielsweise mit Hilfe eines Katheters oder durch Inhalation, Injektionen bzw. Infusionen und die orale Verabreichung. Zur Injektion werden die PNA-Derivate der Formel I in einer flüssigen Lösung, vorzugsweise in einem physiologisch annehmbaren Puffer, wie z.B. Hank's
- 30 Lösung oder Ringer's Lösung, formuliert. Die Oligonucleotide können aber auch in fester Form formuliert werden und vor dem Gebrauch gelöst oder suspendiert

werden. Die für die systematische Verabreichung bevorzugten Dosierungen betragen ca. 0,01 mg/kg bis ca. 50 mg/kg Körpergewicht und Tag.

Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zubereitungen, die PNA-Derivate der Formel I und/oder deren physiologisch verträgliche Salze neben pharmazeutisch einwandfreien Träger- und/oder Zusatzstoffen enthalten. Die PNA-Derivate der Formel I und/oder deren physiologisch verträglichen Salze können am Tier, bevorzugt am Säugetier, und insbesondere am Menschen als Arzneimittel für sich allein, in Mischungen untereinander oder in Form von pharmazeutischen Zubereitungen verabreicht werden, die eine topische, perkutane, parenterale oder enterale Anwendung gestatten und die als aktiven Bestandteil eine wirksame Dosis mindestens eines PNA-Derivats, neben üblichen pharmazeutisch einwandfreien Träger- und Zusatzstoffen enthalten. Die Zubereitungen enthalten normalerweise etwa 0,1 bis 90 Gew.-% der therapeutisch wirksamen Verbindung. Zur Behandlung von Hautkrankheiten wird eine topische Anwendung, z.B. in Form von Salben, Lotionen oder Tinkturen, Emulsionen, Suspensionen bevorzugt.

Die Herstellung der pharmazeutischen Präparate erfolgt in an sich bekannter Weise, (z. B. Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publ. Co., Easton, PA.), wobei pharmazeutisch inerte anorganische und/oder organische Trägerstoffe verwendet werden. Für die Herstellung von Pillen, Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln kann man z.B. Lactose, Maisstärke und/oder Derivate derselben, Talk, Stearinsäure und/oder deren Salze etc. verwenden. Trägerstoffe für Weichgelatine kapseln und/oder Suppositorien sind z.B. Fette, Wachse, halbfeste und flüssige Polyole, natürliche und/oder gehärtete Öle etc. Als Trägerstoffe für die Herstellung von Lösungen und/oder Sirupen eignen sich z.B. Wasser, Saccharose, Invertzucker, Glukose, Polyole etc. Als Trägerstoffe für die Herstellung von Injektionslösungen eignen sich Wasser, Alkohole, Glycerin, Polyole, pflanzliche Öle etc. Als Trägerstoffe für Mikrokapseln, Implantate und/oder Rods eignen sich Mischpolymerisate aus

Glykolsäure und Milchsäure. Darüber hinaus sind Liposomenformulierungen, die dem Fachmann bekannt sind, geeignet (N. Weiner, Drug Develop Ind Pharm 15 (1989) 1523; "Liposome Dermatics, Springer Verlag 1992), beispielsweise HVJ-Liposomen (Hayashi, Gene Therapy 3 (1996) 878). Die  
 5 dermale Applikation kann beispielsweise auch auch unter Zuhilfenahme ionophoretischer oder Methoden und/oder mit Hilfe der Elektroporation erfolgen.

Eine pharmazeutische Zubereitung kann neben den Wirk- und Trägerstoffen  
 10 noch Zusatzstoffe, wie z.B. Füllstoffe, Streck-, Spreng-, Binde-, Gleit-, Netz-, Stabilisierungs-, Emulgier-, Konservierungs-, Süß-, Farbe-, Geschmacks- oder Aromatisierungs-, Dickungs-, Verdünnungsmittel, Puffersubstanzen, ferner Lösungsmittel und/oder Lösungsvermittler und/oder Mittel zur Erzielung eines Depoteffekts, sowie Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks,  
 15 Überzugsmittel und/oder Antioxidantien enthalten. Sie können auch zwei oder mehrere verschiedene PNA-Derivate der Formel I und/oder deren physiologisch verträgliche Salze enthalten sowie ferner neben mindestens einem PNA-Derivate der Formel I einen oder mehrere andere therapeutisch wirksame Stoffe. Die Dosis kann innerhalb weiter Grenzen variieren und ist in jedem  
 20 einzelnen Fall den individuellen Gegebenheiten anzupassen.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von PNA-Derivaten der Formel I als Diagnostikum, insbesondere als Hilfsmittel in der DNA-Diagnostik und in der Molekularbiologie (siehe zum Beispiel: Peptide Nucleic Acids: Protocols  
 25 and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999). In der DNA-Diagnostik spielen Gensonden, auch DNA-Sonden oder Hybridization-Sonden genannt, eine große Rolle zum sequenzspezifischen Nachweis bestimmter Gene. Eine Gensonde besteht im allgemeinen aus einer Erkennungssequenz und einer bzw. mehreren  
 30 geeigneten Markergruppen (Labeln). Die Spezifität der Bestimmung einer Targetsequenz in einer Analysenprobe mittels Hybridisierung mit einer

komplementären Gensonde wird durch die Erkennungssequenz und deren chemische Struktur determiniert. Diese Technik kann auf PNA übertragen werden. Die PNA hat gegenüber den Oligonucleotiden natürlicher Struktur den Vorteil, dass sie eine höhere Affinität zur Targetsequenz und eine höhere

5 Fähigkeit zur Basendiskriminierung aufweist.

Die Anwendung der Verbindungen der Formeln I bezieht sich daher auch auf die in-situ-Hybridisierung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die in-situ-Hybridisierung kann beispielsweise auch zum Nachweis von Mikro-

10 organismen und Viren dienen (Just et al. (1998) J. Vir. Method. 73, 163-174). Eine weitere Anwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen bezieht sich zum Nachweis und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Hierzu bedient man sich bevorzugt auch der Array-Technologie (Strother et al. J. Am. Chem. Soc. (2000) 122, 1205-1209; Niemeyer et al., Angew. Chem. (1999) 111, 3039-3043;

15 Pirrung (1997) Chem. Rev. 97, 473-488), die einen hohen Probendurchsatz und hohe Empfindlichkeit aufweist. Dabei werden die PNA-Sonden auf einem geeigneten Träger oder PNA-Chip fixiert. Hierzu kann PNA wie in den Beispielen beschrieben synthetisiert werden und nachfolgend auf den Träger oder PNA-Chip fixiert werden. Alternativ kann die PNA direkt auf dem Träger

20 hergestellt werden. Eine weitere Anwendung ist der Einsatz der Verbindungen der Formel I als Biosensoren zur Detektion von Nukleinsäuren (Wang et al. (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 7667). Der Einsatz von PNA der Formel I mit einem Affinitätslabel, wie beispielsweise Histidyl-PNA, ist eine weitere Anwendung zur Reinigung von Nukleinsäuren (Oerum et al. (1999), in Peptide

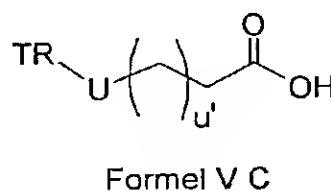
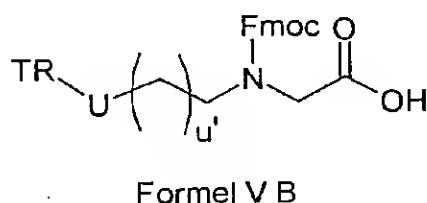
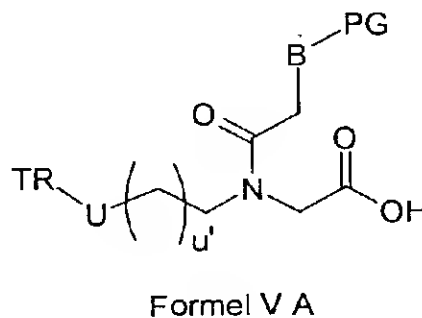
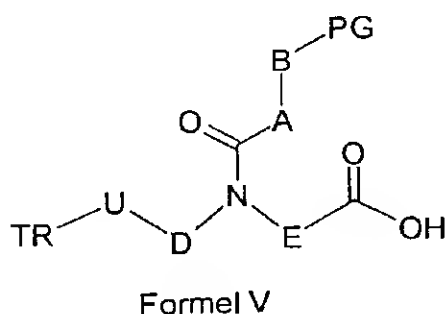
25 Nucleic Acids: Protocols and Applications).

Die Synthese des PNA-Rückgrates erfolgt nach den in der Literatur beschriebenen Methoden, zum Beispiel nach der tert-Butyloxycarbonyl- (BOC), 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc) oder Monomethoxytrityl- (Mmt)

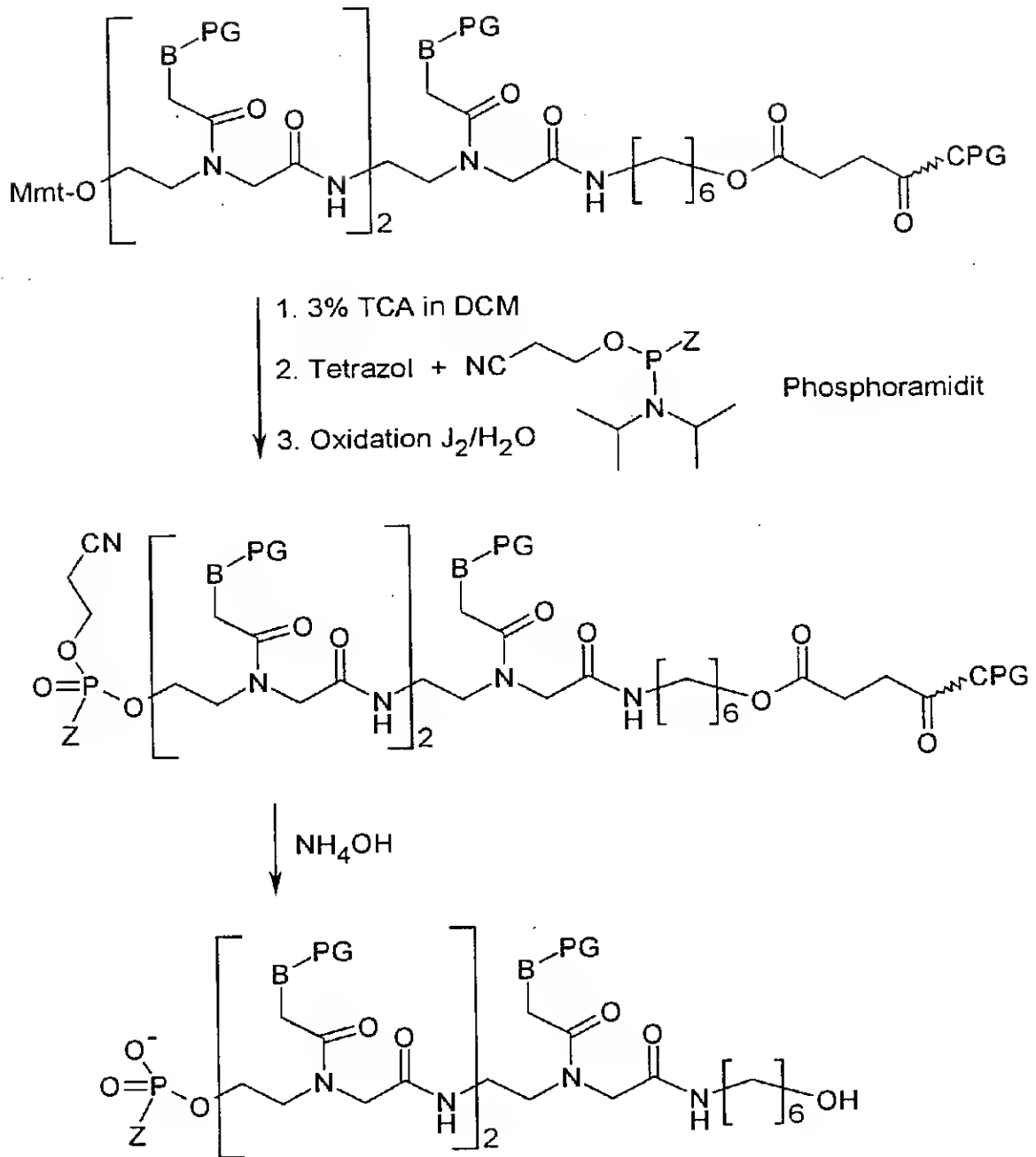
30 Schutzgruppen-Strategie (Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen und Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999).

Vorzugsweise wird die Mmt-Schutzgruppe zum temporären Schutz der Aminofunktion des Aminoethylglycins verwendet und basenlabile Schutzgruppen an den heterozyklischen Nucleobasen (D. Will et al. (1995) Tetrahedron 51, 12069; Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686).

- 5 Beispiele für Monomerbausteine sind Verbindungen der Formel V bis V B, wobei A, B, D, E, u' und U obige Bedeutung haben. PG ist eine Amino-Schutzgruppe wie beispielsweise Benzoyl, Anisoyl-, Isobutyryl-, Acetyl-, tert-Butylbenzoyl (Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686). TR ist eine säurelabile Schutzgruppe wie Dimethoxytrityl (Dmt) (für U = O und S) oder Mmt (für U = NH).
- 10



- 15 Nach Aufbau des PNA-Rückgrates kann die freie Aminofunktion des N-Terminus direkt mit einem entsprechenden Phosphorylierungsreagenz beispielsweise zum entsprechenden Phosphoramidat ( $U = NR_1$  in Formel I) umgesetzt werden.



- So wurde beispielsweise PNA-7 in Beispiel 8 ( $\text{U} = \text{NH}$ ) durch Umsetzung des N-Terminus (am zuletzt gekuppelten Baustein mit  $\text{B} = \text{Adenin}$ ) mit dem Biotin-Phosphoramidit 5 (Figur 4b) erhalten. Alternativ kann im letzten Zyklus ein Dmt-geschützter Hydroxyalkyl- (für  $\text{U} = \text{O}$ ) oder Dmt-geschützter Mercaptoalkyl-

Baustein (für  $U = S$ ) der Formel V A gekoppelt werden. Nach Abspaltung der Dmt-Gruppe kann die freie Hydroxy- oder Mercaptofunktion beispielsweise mit dem Phosphorylierungsreagenz 1 (Figur 4a) zur Reaktion gebracht werden. Nach Oxidation, Abspaltung vom Träger und Entfernung der Schutzgruppen erhält man das Phosphat ( $V = W = X = Y = O$ ) bzw. Thiophosphat ( $V = S$ ,  $W = X = Y = O$ ) der Formel I. Soll die aminoternale Einheit keine Nucleobase beinhalten (B gleich Wasserstoff), so wird der Baustein gemäss Formel V B in der Kondensationsreaktion des letzten Zyklus eingesetzt, wobei die Fmoc-Schutzgruppe am Ende der Synthese mit Ammoniak abgespalten wird. Der Aminoternus der PNA kann durch Kondensation von Bausteinen der Formel V C verlängert werden, bevor die eigentliche Phosphorylierungsreaktion durchgeführt wird.

Die Phosphoryl-Reste können mit Hilfe von in der Nucleotid-Chemie üblicherweise verwendeten Reagenzien eingeführt werden, beispielsweise durch die Phosphoramidit-Methode, die H-Phosphonat-Methode oder die Phosphotriester-Methode (E. Sonveaux (1986) Bioorganic Chemistry 14, 274; S. L. Beaucage und R. P. Iyer (1993) Tetrahedron 49, 1925; E. Uhlmann und A. Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 543). Es sind zahlreiche Phosphorylierungsreagenzien zugänglich (Glen Research Corporation, Sterling, VA 20164, U.S.A.), die zur Herstellung der Verbindungen der Formel I herangezogen werden können. Eine Auswahl der Reagenzien ist in den Figuren 4a bis 4d gezeigt, wobei die Erfindung aber nicht auf diese speziellen Derivate beschränkt ist. Bei der oben beschriebenen Phosphorylierungsreaktion kann Z auch die Bedeutung von X haben, wobei reaktive Funktionen intermediär durch geeignete Schutzgruppen geschützt sind.

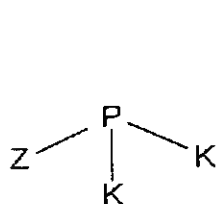
Wie vielfältig die aminoternale Modifikation ist, kann anhand der Synthese von PNA-6, PNA-12, PNA-13, und PNA-14 verdeutlicht werden. Zunächst wird die PNA t(oeg)-at tcc gtc at-hex-CPG (PNA-Basen sind durch kleine Buchstaben für die entsprechenden Nucleobasen abgekürzt; oeg steht für

Hydroxyethylglycin) in vollständig geschützter Form am CPG-Träger (controlled pore glass) aufgebaut, das als letzten Baustein ein Hydroxyethylglycin-(oeg)-acetylthymine trägt. Die Hydroxygruppe kann nun individuell mit den

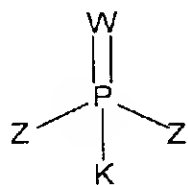
Phosphoramiditen 1, 5, 7 bzw. 3 umgesetzt werden. Nach Oxidation,

- 5 Abspaltung der Schutzgruppen und Spaltung des Produkts vom CPG-Träger erhält man entsprechend PNA-6, PNA-12, PNA-13 bzw. PNA-14. Als feste Träger werden ausserdem @TentaGel (Fa. Rapp Polymers GmbH, Tübingen) und Aminomethylpolystyren benutzt.

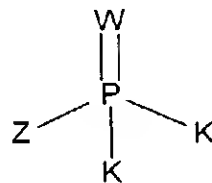
- 10 Zur Einführung der Phosphoryl-Funktion kommen im Prinzip alle in der Nucleotidchemie bekannten Reagenzien in Betracht, insbesondere aber die folgenden Reagenzien der Formel VI A, Formel VI B, Formel VI C und Formel VI D



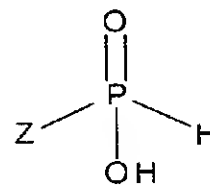
15 Formel VI A



Formel VI B



Formel VI C



Formel VI D

wobei K gleich Halogen, bevorzugt Cl, Triazolyl, Imidazolyl, oder Dialkylamino ist und Z die oben genannte Bedeutung oder die Bedeutung von X hat, wobei reaktive Gruppen entsprechend geschützt sind. Beispielsweise sind die

- 20 Hydroxygruppen des Fluorescein-Phosphoramidits 3 (Figur 4a) durch Veresterung mit Pivalinsäure geschützt.

Die Verbindungen der Formel VI sind nur als Beispiele für solche Reagenzien zu sehen, die gegebenenfalls unter Zugabe weiterer Hilfsreagenzien wie

- 25 Basen, Säuren oder Kondensationsreagenzien reagieren. Besonders bevorzugt sind die Reagenzien der Formel VI A, die nach der Phosphoramidit-Methode reagieren (Beaucage und Iyer, 1993). Diese werden als Phosphor-(III)-Verbindung zur Reaktion gebracht und anschließend oxidiert. Wird die



Oxidation beispielsweise mit Jod/Wasser/Pyridin oder tert-Butylhydroperoxid durchgeführt, erhält man die Phosphorylderivate ( $W = O$ ). Erfolgt die Oxidation dagegen mit elementarem Schwefel oder Beaucage-Reagenz, so erhält man die entsprechende Thiophosphoryl-Verbindung ( $W = S$ ).

5

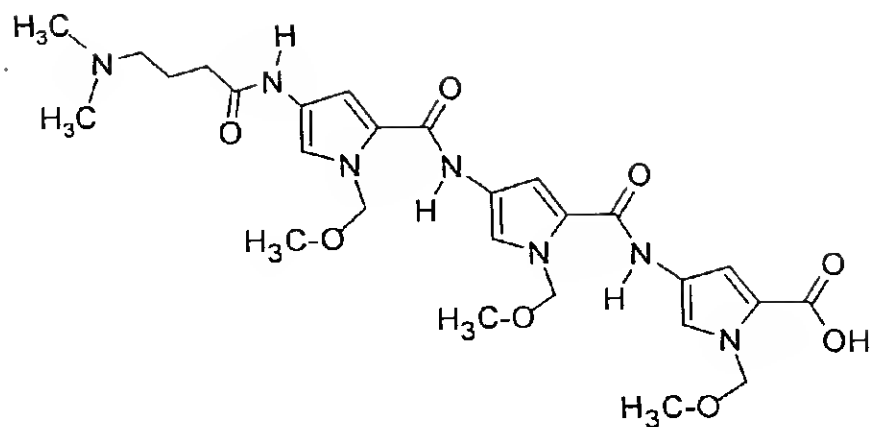
Unter den Reagenzien (Figuren 4a bis 4d) befinden sich auch "bifunktionelle Reagenzien", die aufgrund einer zweiten Funktion, welche zunächst geschützt ist, mehrfach zur Reaktion gebracht werden können. Beispiele für solche bifunktionellen Reagenzien sind die Phosphoramidite 4, 6, 8 bis 13. Dabei kann es sich um die multiple Konjugation eines Reagenzes oder aber um die sukzessive Reaktion mit unterschiedlichen Reagenzien handeln. So kann beispielsweise das Fluorescein-Phosphoramidit 3 nur einmal zur Reaktion gebracht werden. Dagegen besitzt das Fluorescein-Phosphoramidit 4 eine durch eine Dmt-Gruppe geschützte Hydroxyfunktion, die nach Abspaltung der Dmt-Gruppe nochmals mit einem Phosphorylierungsreagenz zur Reaktion gebracht werden kann. Auf diese Weise können ein und dieselbe Gruppe oder aber unterschiedliche Gruppen mehrfach eingeführt werden. PNA-16 ist ein typisches Beispiel für eine Mehrfachkonjugation. Nach Aufbau der PNA-Kette wurde im letzten Zyklus ein Hydroxyethylglycin-C-Baustein gekoppelt, der sukzessive zweimal mit dem Spacer-18 Phosphoramidit 9, dem Aminomodifizier-5 Phosphoramidit 12 und schliesslich mit Lexitropsin der Formel VII unter Aktivierung mit Peptid-Kupplungsreagenzien, wie HBTU, umgesetzt wurde. Die Kopplung eines Aminomodifiers gestattet die anschliessende Einführung eines weiteren Restes, der in Form eines aktivierten Carbonsäurederivats einföhrbar ist. Hierbei können beispielsweise auch Isothiocyanate und N-Hydroxy-succinimidester eingesetzt werden.

10

15

20

25



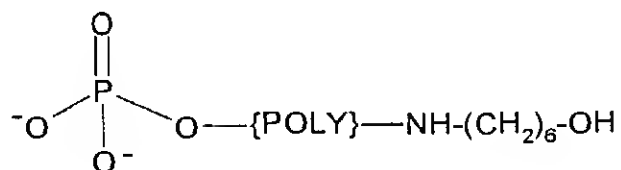
Formel VII

- In Figur 5a und 5b sind einige Beispiele von Verbindungstypen für die N-terminale Modifikation der Verbindungen der Formel I gezeigt. Verbindungstyp A erhält man durch Reaktion der endständigen Hydroxygruppe der PNA mit dem Phosphorylierungsreagenz 1. Verbindungstyp B erhält man durch Reaktion der endständigen Aminogruppe der PNA mit dem Biotin-Phosphoramidit 5. Verbindungstyp C erhält man durch sukzessive Umsetzung der PNA mit einer endständigen Hydroxygruppe mit dem Spacer-18 Phosphoramidit 9, Aminomodifizier-5 Phosphoramidit 12 und Lexitropsin. Verbindungstyp D erhält man durch sukzessive Umsetzung der PNA mit einer endständigen Hydroxygruppe mit dem Spacer-9 Phosphoramidit 8 und dem Cyanin-3 Phosphoramidit 10. Verbindungstyp E erhält man durch sukzessive Umsetzung der PNA mit einer endständigen Hydroxygruppe mit dem bifunktionellen Fluorescein-Phosphoramidit 4, dem Spacer-9 Phosphoramidit 8, und dem C16-Phosphorylierungsreagenz 7. Verbindungstyp F erhält man durch Reaktion der endständigen Aminogruppe der PNA mit 4-Hydroxybuttersäure, deren Hydroxyfunktion intermediär durch eine Dmt-Gruppe geschützt ist, und anschließender Reaktion mit dem Fluorescein-Phosphoramidit 3. Die zusätzlich durchzuführenden Schritte, wie Oxidation und Schutzgruppenabspaltung, sind in den Beispielen beschrieben.

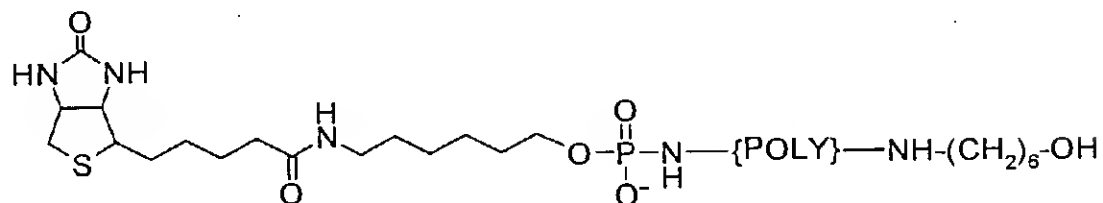
Beispiele:

Die Herstellung folgender Verbindungen ist exemplarisch beschrieben:

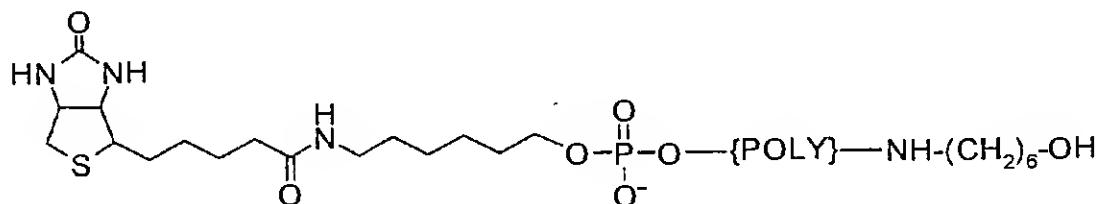
5 PNA-1 bis PNA-6:



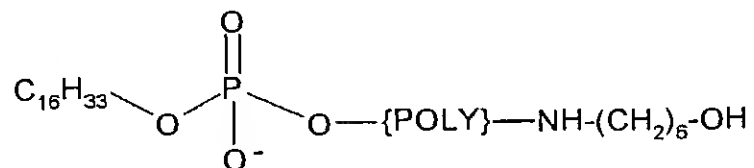
10 PNA-7:



15 PNA-8 bis PNA-12:

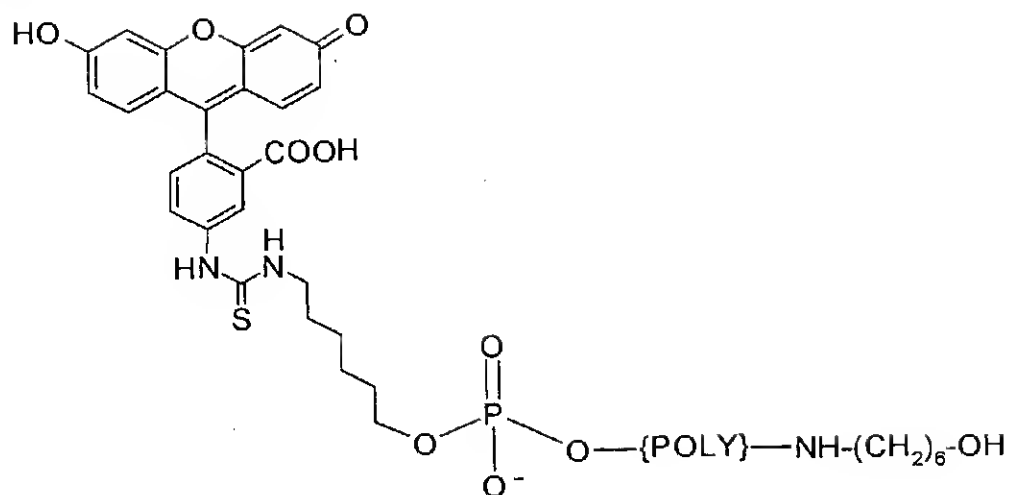


20 PNA-13:



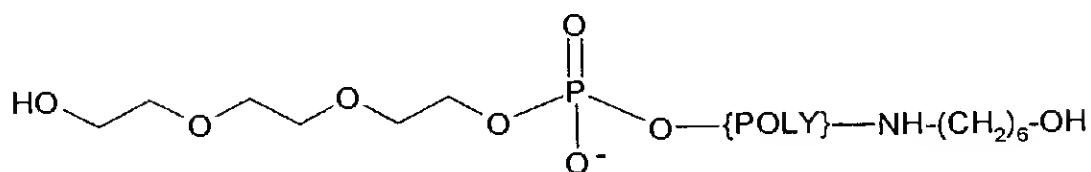
25

PNA-14:

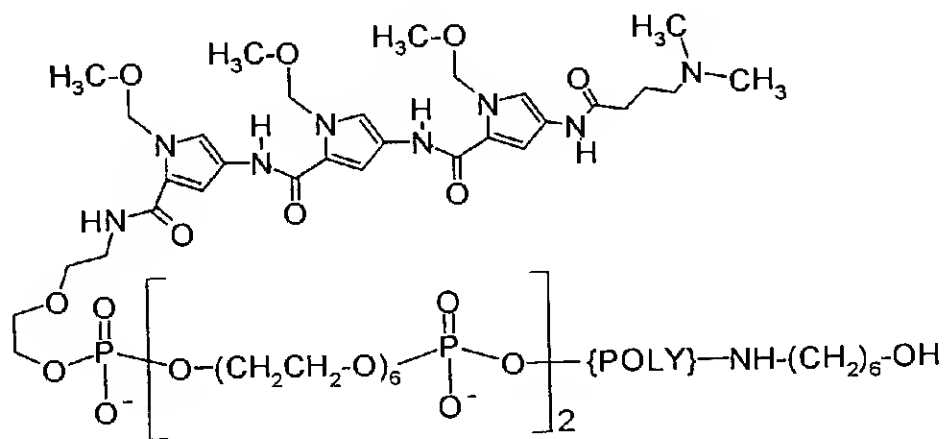


PNA-15:

5



PNA-16:



10

wobei die Basenabfolge wird jeweils beschrieben durch die folgenden Sequenzen,

15

	SEQ ID NO. 53	5'-A A C T-3'	(PNA-1)
	SEQ ID NO. 54	5'-A C A T C A T G G T C G-3'	(PNA-2)
	SEQ ID NO. 55	5'-C C A C G A T G A T G T-3'	(PNA-3)
	SEQ ID NO. 56	5'-G A G C C A T G T A T A G T G A C-3'	(PNA-4)
5	SEQ ID NO. 57	5'-T C G G T T T G A G A T C T G G-3'	(PNA-5)
	SEQ ID NO. 58	5'-T A T T C C G T C A T-3'	(PNA-6, PNA-12, PNA-13, PNA-14)
	SEQ ID NO. 59	5'-A C T G A T G T A G T C-3'	(PNA-7)
	SEQ ID NO. 60	5'-G C T G A T G T A G T C-3'	(PNA-8)
10	SEQ ID NO. 61	5'-G G T A T G G G A T A T-3'	(PNA-9, PNA-11)
	SEQ ID NO. 62	5'-T G A A G G A A G A G G-3'	(PNA-10)
	SEQ ID NO. 63	5'-G T T A G G G T T A G-3'	(PNA-15)
	SEQ ID NO. 64	5'-C <u>C</u> C <u>C</u> T T <u>C</u> C-3'	(PNA-16)

15 und wobei {POLY} durch Formel II beschrieben wird, {BLOCK} jeweils durch Formel IIIA beschrieben wird, und wobei ferner A und E gleich CH<sub>2</sub> sind und D gleich (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> ist, und z' sich jeweils aus der Sequenzlänge des Oligomers ergibt.

20

#### Beispiel 1: Synthese der PNA-Kette

Zur Herstellung des PNA-Teils wurden die folgenden Reagenzien verwendet:

1. Phosphoramidit-Reagenz (0.1 M in Acetonitril (ACN))
- 25 2. Mmt-PNA-Monomere bzw. Dmt-oeg-PNA-Monomere (0.2 M in DMF:ACN (1:1; v:v))
3. Wasserfreies ACN ( $\leq 30$  ppm Wasser)
4. Trichloressigsäure (3 %) in Dichloromethan (DCM)
5. Acetanhydrid, 2,6-Lutidin in THF (1:1:8; v:v:v); (Cap A)
- 30 6. N-Methylimidazol (16 %) in THF; (Cap B)

7. Jodlösung (0.05 M) in THF, Wasser, Pyridin, (7:2:1; v:v:v)
  8. Waschlösung (THF, Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v))
  9. Tetrazol (0.3 M) in ACN
  10. HBTU; 0.2 M in DMF:ACN (1:1; v:v)
  - 5 11. DIPEA; 0.2 M in DMF:ACN (1:1; v:v)
  12. DMF (> 99.5 %)
  13. Festphasenträger: Aminopropyl-CPG (550 Å) beladen mit Mmt-Aminohex-1-yl hemisuccinat (für PNA-hexylamide).
- 10 Die Mmt/Acyl-geschützten bzw. Dmt/Acyl-geschützten oeg-Monomere wurden wie bereits beschrieben hergestellt (Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686). Die Beladung von Aminopropyl-CPG mit dem Mmt-Aminohex-1-yl-hemisuccinat wurde ebenfalls bereits beschrieben (Will et al. (1995) Tetrahedron 51, 12069-12082). Die PNA-Synthesen wurden im allgemeinen im
- 15 Massstab von 2 bis 5 µmol durchgeführt.

Folgender Zyklus wurde zur PNA-Synthese verwendet:

1. Waschschrift mit ACN
2. Entschützung der Mmt-Gruppe bzw. Dmt-Gruppe durch Behandlung mit 3%
- 20 TCA in DCM; 110 sec.
3. Waschschrift mit DMF/ACN (1:1)
4. Neutralisierung mit DIPEA in DMF/ACN (1:1)
5. Kupplung des Monomer-Bausteins durch Voraktivierung (15 min) mit HBTU/DIPEA/PNA-Monomer (Verhältnis 1:1:1; Gesamtvolumen 450 µl)
- 25 Beschickung der Festphase und Kupplung (45 min)
6. Waschschrift mit ACN
7. Capping mit Acetanhydrid/N-Methylimidazol
8. Waschschrift mit ACN
9. Neuer Zyklus

### Beispiel 2: Synthese von Phosphat-{a(oeg) act}-hex (PNA-1)

Der PNA-Teil wird wie in Beispiel 1 beschrieben durch Festphasensynthese hergestellt (2  $\mu$ mol Synthese). Im letzten Zyklus wird ein auf Hydroxyethylglycin (oeg) basierender Baustein mit Adenin als Nucleobase gekuppelt (Formel V A; wobei TR gleich Dmt, U gleich Sauerstoff, u' gleich 2, PG gleich Anisoyl und B gleich Adenin ist). Nach Abspaltung der terminalen Dmt-Gruppe mit 3% TCA wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Phosphorylierungsreagenz 1 (Figur 4a) unter Tetrazol-Katalyse zur Reaktion gebracht. Dabei werden das

10 Phosphorylierungsreagenz 1 im Überschuss (ca. 25-fach) als 0.3 M Lösung in Acetonitril/Tetrahydrofuran (1:1; v:v) und das Tetrazol (ca. 50-fach; 0.5 M in Acetonitril) eingesetzt. Nach erfolgter Kondensation wird mit einer Jodlösung (0.05 M in Tetrahydrofuran/Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v)) oxidiert. Dann wird das PNA durch Behandlung mit konz. Ammoniak bei 50°C über Nacht vom

15 Träger gespalten und gleichzeitig die Schutzgruppen entfernt. Man erhält 83 OD (260 nm). Davon werden 40 OD durch präparative Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese gereinigt. Die gewünschte Produktbande wird mit 0.2M Triethylammoniumbikarbonat-Puffer eluiert und über eine Bond-Elut C18-Säule (1 g) entsalzt. Man erhält 13.5 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-

20 Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 1266.2; gef. 1265.9).

### Beispiel 3: Synthese von Phosphat-{a(oeg) ca tca tgg tgc}-hex (PNA-2)

25 Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben in einer 2  $\mu$ mol Synthese. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 122 OD Rohprodukt, welches über ein 15% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 27 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3450.3; gef. 3450.4).

30

### Beispiel 4: Synthese von Phosphat-{c(oeg) ca cga tga tgc}-hex (PNA-3)

Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben in einer 2  $\mu$ mol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Cytosin als Nucleobase gekuppelt wird. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 124 OD Rohprodukt, welches über ein 15% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 19 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3450.3; gef. 3450.1).

10 Beispiel 5: Synthese von Phosphat-{g(oeg)-ag cca tgt ata gtg ac}-hex (PNA-4)

Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben in einer 2  $\mu$ mol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Guanin als Nucleobase gekuppelt wird. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 120 OD Rohprodukt. 60 OD des Rohprodukts wurden über ein 15% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt. Man erhält 10 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 4848.6; gef. 4849.9).

20 Beispiel 6: Synthese von Phosphat-{t(oeg) cg gtt tga gat ctg g}-hex (PNA-5)

Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben in einer 2  $\mu$ mol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase gekuppelt wird. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 250 OD Rohprodukt. 60 OD des Rohprodukts wurden über ein 15% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt. Man erhält 22.9 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 4595.4; gef. 4596.3).



Beispiel 7: Synthese von Phosphat-{t(oeg)-at tcc gtc at}-hex (PNA-6)

Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 2 beschrieben in einer 0.5 µmol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase gekuppelt wird. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 63 OD Rohprodukt. 30 OD des Rohprodukts wurden über ein 15% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt. Man erhält 4.2 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3124.5; gef. 3124.8).

10

Beispiel 8: Synthese von Biotin-p-{act gat gta gtc}-hex (PNA-7)

Der PNA-Teil wird wie in Beispiel 1 beschrieben durch Festphasensynthese hergestellt (2 µmol Synthese). Im letzten Zyklus wird ein normaler PNA-Baustein mit Adenin als Nucleobase gekuppelt (Formel V A; wobei TR gleich Mmt, U gleich NH, u' gleich 2, PG gleich Anisoyl und B gleich Adenin ist). Nach Abspaltung der terminalen Mmt-Gruppe mit 3% TCA wird die freie Aminofunktion mit dem Biotin-Phosphoramidit 5 (Figur 4b) unter Tetrazol-Katalyse zur Reaktion gebracht. Dabei werden das Phosphorylierungsreagenz im Überschuss (ca. 10-fach) als 0.12 M Lösung in Acetonitril und das Tetrazol (ca. 50-fach; 0.5 M in Acetonitril) eingesetzt. Nach erfolgter Kondensation wird mit einer Jodlösung (0.05 M in Tetrahydrofuran/Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v)) oxidiert. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 288 OD Rohprodukt. Das Rohprodukt wurde über ein 15% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt. Man erhält 17.5 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3789.6; gef. 3789.8).

20

25

Beispiel 9: Synthese von Biotin-p-{g(oeg)-ct gat gta gtc}-hex (PNA-8)

Der PNA-Teil wird wie in Beispiel 1 beschrieben durch Festphasensynthese hergestellt (1 µmol Synthese). Im letzten Zyklus wird ein auf Hydroxyethylglycin

30

basierender Baustein mit Guanin als Nucleobase gekuppelt (Formel V A; wobei TR gleich Dmt, U gleich Sauerstoff, u' gleich 2, PG gleich Anisoyl und B gleich Guanin ist). Nach Abspaltung der terminalen Dmt-Gruppe mit 3% TCA wird die freie Hydroxyfunktion mit dem Biotin-Phosphoramidit 5 (Figur 4b) unter

- 5    Tetrazol-Katalyse zur Reaktion gebracht. Dabei werden das Phosphorylierungsreagenz im Überschuss (ca. 10-fach) als 0.12 M Lösung in Acetonitril und das Tetrazol (ca. - 50-fach; 0.5 M in Acetonitril) eingesetzt. Nach erfolgter Kondensation wird mit einer Jodlösung (0.05 M in Tetrahydrofuran/Wasser, Pyridin (7:2:1; v:v:v)) oxidiert. Nach der Spaltung mit
- 10    Ammoniak erhält man 63 OD Rohprodukt. Das Rohprodukt wurde über ein 15% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt. Man erhält 11.2 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3806.8; gef. 3807.2).

- 15    Beispiel 10: Synthese von Biotin-p-{g(oeg) gt atg gga tat}-hex (PNA-9)

- Die Herstellung erfolgte analog wie in Beispiel 9 beschrieben in einer 2 µmol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Guanin als Nucleobase gekuppelt wird. Der Biotin-Rest wurde mit
- 20    dem Biotin-Phosphoramidit 5 (Figur 4b) eingeführt. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 274 OD Rohprodukt. Das Rohprodukt wurde über ein 15% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 25.8 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3870.8; gef. 3869.7).

25

- Beispiel 11: Synthese von Biotin-p-{t(oeg) ga agg aag agg}-hex (PNA-10)

- Die Herstellung erfolgte analog wie in Beispiel 9 beschrieben in einer 2 µmol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender
- 30    Baustein mit Thymin als Nucleobase gekuppelt wird. Der Biotin-Rest wurde mit dem Biotin-Phosphoramidit 5 (Figur 4b) eingeführt. Nach der Spaltung mit

Ammoniak erhält man 190 OD Rohprodukt. Das Rohprodukt wurde über ein 12% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 29 OD mit dem erwarteten Molekulargewicht (ber. 3913.9; gef. 3913.7).

5 Beispiel 12: Synthese von Biotin-p-{g(oeg)-gt atg gga tat}-hex (PNA-11)

Die Herstellung erfolgte analog wie in Beispiel 9 beschrieben in einer 2 µmol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Guanin als Nucleobase gekuppelt wird. Der Biotin-Rest wurde mit  
10 dem Biotin-Phosphoramidit 5 (Figur 4b) eingeführt. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 162 OD Rohprodukt. Das Rohprodukt wurde über ein 12% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 21 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3870.8; gef. 3870.8).

15

Beispiel 13: Synthese von Biotin-p-{t(oeg) at tcc gtc at}-hex (PNA-12)

Die Herstellung erfolgte analog wie in Beispiel 9 beschrieben in einer 0.5 µmol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender  
20 Baustein mit Thymin als Nucleobase gekuppelt wird. Der Biotin-Rest wurde mit dem Biotin-Phosphoramidit 5 (Figur 4b) eingeführt. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 67 OD Rohprodukt. Das Rohprodukt wurde über ein 12% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 8.5 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die  
25 berechnete Masse bestätigte (ber. 3449.5; gef. 3449.9).

Beispiel 14: Synthese von Hexadecyl-O-p-{t(oeg) at tcc gtc at}-hex (PNA-13)

Die Herstellung erfolgte analog wie in Beispiel 9 beschrieben in einer 0.5 µmol  
30 Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase gekuppelt wird. Der Hexadecyl-Rest wurde

mit dem C16-Phosphorylierungsreagenz 7 (Figur 4c) eingeführt. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 58 OD Rohprodukt. Das Rohprodukt (30 OD) wurde über ein 12% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 2 OD mit dem erwarteten Molekulargewicht (ber. 3349.4; gef. 3349.7).

5

Beispiel 15: Synthese von Fluorescein-p-{t(oeg) at tcc gtc at}-hex (PNA-14)

Die Herstellung erfolgte analog wie in Beispiel 9 beschrieben in einer 0.5 µmol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase gekuppelt wird. Der Fluorescein-Rest wurde mit dem Fluorescein-Phosphoramidit 3 (Figur 4a) eingeführt. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 62 OD Rohprodukt. Das Rohprodukt (30 OD) wurde über ein 12% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 4.2 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3581.5; gef. 3582.4).

15

Beispiel 16: Synthese von HO-spacer9-p-{g(oeg)-tt agg gtt ag}-hex (PNA-15)

Die Herstellung erfolgte analog wie in Beispiel 9 beschrieben in einer 1 µmol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Thymin als Nucleobase gekuppelt wird. Der Spacer-9 wurde mit dem entsprechenden Phosphoramidit 8 (Figur 4c) eingeführt. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 52 OD Rohprodukt. Das Rohprodukt (30 OD) wurde über ein 15% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 1.8 OD. Das Produkt wurde durch Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3402.3; gef. 3401.8).

25

Beispiel 17: Synthese von Lexitropsin-aminolinkC5-p-spacerC18-p-spacerC18-p-{c(oeg)-c cct tcc}-hex (PNA-16; wobei c gleich ein pseudo-iso-Cytosin PNA-Baustein ist)

30

Die Herstellung erfolgte analog wie in Beispiel 9 beschrieben in einer 1 µmol Synthese, wobei im letzten Zyklus ein auf Hydroxyethylglycin basierender Baustein mit Cytosin als Nucleobase gekuppelt wird. Dann werden nacheinander zweimal das Spacer-18 Phosphoramidit 9 und einmal das

5 Aminomodifizier-5 Phosphoramidit 12 (Figur 4d) kondensiert. Nach den Kupplungsreaktionen wurde die Dmt- bzw. Mmt-Gruppe jeweils durch Behandlung mit 3% Trichloressigsäure abgespalten. Zur Kupplung des Lexitropsins gibt man 300 µl des entsprechenden Aktivesters zu und läßt 3

10 Stunden reagieren (hergestellt aus 0.1 M Lexitropsincarbonsäure, 0.1M TBTU, und 0.4M Diisopropylethylamin; 1:1:1 =v:v:v; 30 min. Voraktivierung). Danach wird mit DMF gewaschen. Nach der Spaltung mit Ammoniak erhält man 43 OD Rohprodukt. Das Rohprodukt (35 OD) wurde über ein 15% PAA-Gel durch Elektrophorese gereinigt wird. Man erhält 5.3 OD. Das Produkt wurde durch

15 Negativionen-Massenspektrometrie analysiert, welche die berechnete Masse bestätigte (ber. 3583.5; gef. 3583.1).

#### Beispiel 18: Bestimmung der Schmelztemperaturen

Die Bestimmung der Schmelztemperaturen erfolgte mit Hilfe eines HP 8452A

20 Diodenarray-Spektrophotometers, eines HP 89090A Peltier-Elements und der HP Temperature Control Software Rev. B5.1 (Fa. Hewlett Packard). Es wird in 0.5°C/min Schritten in 140 mM KCl, 10 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0.1mM EDTA (pH 7.4) als Puffer gemessen. Die Oligomerkonzentration beträgt 0.5 bis 1 OD<sub>260</sub> pro ml.

25

Überraschenderweise zeigten die phosphorylmodifizierten PNA-6, PNA-12 bis PNA-14 Derivate eine höhere Bindung gegenüber komplementärer DNA und RNA als die ungeladene PNA (Referenzsubstanz).

30

PNA-Derivat		T <sub>m</sub> (DNA)	T <sub>m</sub> (RNA)
Referenz	Ac-HN-tat tcc gtc at-hex	41.9°C	56.6°C
PNA-6	p-{t(oeg)-at tcc gtc at}-hex	44.0°C	57.5°C
PNA-13	Hexadecyl-O-p-{t(oeg) at tcc gtc at}-hex	46.7°C	58.9°C
PNA-14	Fluorescein-p-{t(oeg) at tcc gtc at}-hex	42.5°C	56.7°C
PNA-12	Biotin-p-{t(oeg) at tcc gtc at}-hex	43.6°C	57.9°C

### Beispiel 19: Bestimmung der Zellaufnahme nach Fluoreszenz-Markierung

- 5 Man läßt die COS-Zellen bis zur Konfluenz in Dulbecco's MEM (DMEM), das mit 10% FCS supplementiert wurde, in 5 cm Petrischalen heranwachsen. Die Zellen werden zweimal mit serumfreien DMEM gewaschen. Mit Hilfe einer sterilen Nadel wird eine Fläche von ca. 1 cm<sup>2</sup> der Mitte der Petrischale eingekratzt. In diese Fläche wird die zu untersuchende PNA-Lösung (10 µM)
- 10 aufgebracht. Es wird bei 37°C unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Nach 2, 4 und 16 Stunden werden die Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu werden die Zellen viermal mit serumfreien DMEM gewaschen, mit einem Glasträger abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bzw. durch Phasenkontrast bewertet.

15

Zur Untersuchung der Zellaufnahme wurden PNA-6 und PNA-13 am C-terminus mit Fluorescein markiert und mikroskopisch untersucht.

p-{t(oeg)-at tcc gtc at}-Fluorescein

- 20 Hexadecyl-O-p-{t(oeg) at tcc gtc at}-Fluorescein

Dabei zeigte sich, dass das Hexadecyl-PNA-Derivat (PNA-13) effizienter in die Zellen aufgenommen wurde.

## Beispiel 20: Hemmung der Zellproliferation durch PNA-13

Die Sequenz von PNA-13 ist gegen den Translationsstart der Ha-ras mRNA gerichtet. Die REH-Zellen (human pre-B leukemia cells, DSM ACC 22) oder A549-Tumorzellen wurden in OptiMEM (Gibco BRL) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, GIBCO-BRL) bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zelldichte für den Assay war ca.  $1 \times 10^6$  / ml ). Die PNA-13 (10 µM ) wurde mit den Zellen in 24-well Platten inkubiert. Nach 96 Inkubation bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> wurde die Zelldichte bestimmt. Mittelwerte der Zelldichte wurden aus 3 individuellen Löchern einer PNA Konzentration ermittelt. Es zeigte sich, dass PNA-13 die Proliferation der REH Zellen hemmt. Nach > 4 Tagen Inkubationszeit ist die Hemmung durch PNA-13 stärker als durch ein entsprechendes Phosphorothioat-Oligonucleotid.

### 15 Abkürzungsverzeichnis:

ACN	Acetonitril
BOC	tert-Butyloxycarbonyl
<u>C</u> , <u>c</u>	pseudo-iso-Cytosin
COS	CV1 Origin SV 40
CPG	controlled pore glass
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's MEM
DMF	Dimethylformamid
Dmt	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitroaryl
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl

HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
hex	-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -OH
MEM	Modified Eagle's minimal essential medium
Mmt	Monomethoxytrityl
OD	Optische Dichte
oeg	N-(2-Hydroxyethyl)glycin
PAA	Polyacrylamid
PG	Schutzgruppe
PNA	Polyamidnukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TCA	Trichloressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TR	säurelabile Schutzgruppe

Figuren 1a, 1b, 2b und 3b zeigen Beispiele für endständige Reste Z.

- 5 Figuren 2a und 3a zeigen Beispiele für verbrückende Reste X.

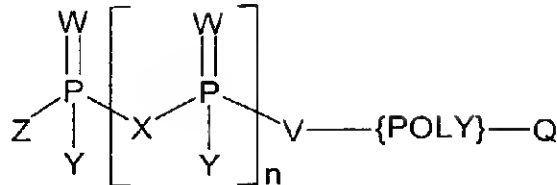
Figuren 4a, 4b, 4c und 4d zeigen Beispiele für Phosphorylierungsreagenzien.

Figuren 5a und 5b zeigen Beispiele für die einfache (A, B) und multiple (C bis F)

- 10 N-terminale Derivatisierung von PNA.



## 1. PNA-Derivat der Formel I



Formel I

wobei

V unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel,  $\text{NR}_1$ , eine Gruppe  $\text{U}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{\text{U}'}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}$  oder eine Gruppe  $\text{U}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{\text{U}'}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}$  ist,

U unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder NH ist,

$\text{u}'$  unabhängig voneinander gleich 1 bis 10 ist, vorzugsweise 1 bis 4, besonders bevorzugt 1,

W unabhängig voneinander gleich Sauerstoff, Schwefel oder  $\text{NR}_1$  ist,

Y unabhängig voneinander gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion, Thioat oder  $\text{NR}_1\text{R}_2$  ist,

$\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  unabhängig voneinander einen Rest bestehend aus Wasserstoff oder  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ -Alkyl bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,

$R_3$  und  $R_4$  unabhängig voneinander einen Rest bestehend aus Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl oder den Rest einer Aminosäure-Seitenkette bedeuten, vorzugsweise Wasserstoff,

5

X unabhängig voneinander gleich eine Gruppe  $U-(C_2-C_{22}$ -Alkandiy)-U oder eine Gruppe  $U-(CH_2CH_2-O)_u$  ist,

10

oder X gleich eine bifunktionelle Markergruppe ist, bevorzugt aus der Gruppe der Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Acridin-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Digoxigenin- oder Edans-Derivate, besonders bevorzugt ein Biotin-Derivat,

15

oder X gleich eine bifunktionelle Gruppe zur Quervernetzung mit komplementären Nukleinsäuren ist, bevorzugt ein Psoralen-Derivat,

20

oder X gleich eine bifunktionelle Gruppe ist, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigt, bevorzugt aus der Gruppe der Cholesteryl-, Adamantyl- und Vitamin-E-Derivate,

oder X gleich eine bifunktionelle Gruppe ist, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivates an eine Target-Nukleinsäure steigert, bevorzugt Acridin- und Lexitropsin-Derivate,

25

Z gleich Hydroxy, Mercapto, Oxyanion, Thioat oder  $NR_1R_2$ ,  $C_1$ - $C_{22}$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_8$ -Arylalkyl,  $C_1$ - $C_{22}$ -Alkyl-U,  $C_1$ - $C_8$ -Arylalkyl-U, Hydroxy- $C_1$ - $C_{18}$ -U, Aminoalkyl-U, Arylalkyl-U, Mercaptoalkyl-U ist, oder eine Gruppe der Formel  $R_9(CH_2CH_2-O)_m$  ist, wobei  $R_9$

gleich Hydroxy, Amino oder C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkoxy und m gleich 1 bis 100 ist, vorzugsweise 2 bis 10,

5 oder Z gleich eine monofunktionelle oder bifunktionelle Markergruppe ist, bevorzugt aus der Gruppe der Fluorescein-, Rhodamin-, TAMRA-, Biotin-, Pyren-, Dinitrophenyl-, Acridin-, Cyaninfarbstoff-, Dabcyl-, Digoxigenin- oder Edans-Derivate, besonders bevorzugt ein Biotin-Derivat,

10 oder Z gleich eine monofunktionelle oder bifunktionelle quervernetzenden Gruppe ist, bevorzugt ein Psoralen-Derivat,

15 oder Z gleich eine monofunktionelle oder bifunktionelle Gruppe ist, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigt, bevorzugt aus der Gruppe der Cholesteryl-, Adamantyl- und Vitamin-E-Derivate,

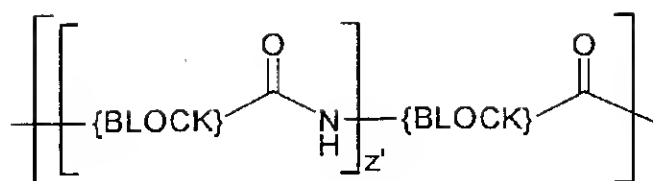
20 oder Z gleich eine monofunktionelle oder bifunktionelle Gruppe ist, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivates an eine target-Nukleinsäure steigert, bevorzugt ein Lexitropsin-Derivat,

n gleich 0 bis 10 ist, vorzugsweise 0 bis 3,

25 Q gleich Hydroxy, Amino, NHR<sub>7</sub>, NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>, Aminosäure-Derivat oder ein Peptid-Rest ist,

R<sub>7</sub> und R<sub>8</sub> unabhängig voneinander C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl oder Hydroxy-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl sind,

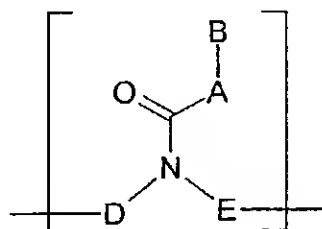
30 und wobei {POLY} beschrieben wird durch die Formel II



Formel II

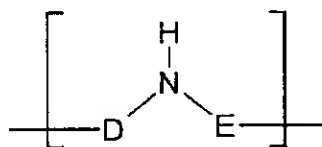
wobei {BLOCK} unabhängig voneinander entweder beschrieben wird durch Formel IIIA,

5



Formel IIIA

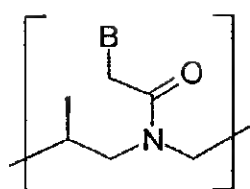
oder Formel IIIB,



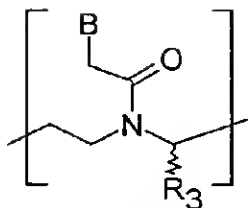
Formel IIIB

10

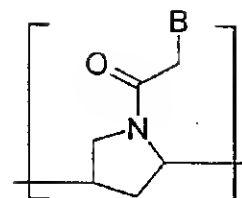
oder Formel IV A bis IV G,



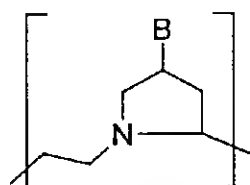
Formel IV A



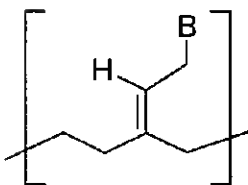
Formel IV B



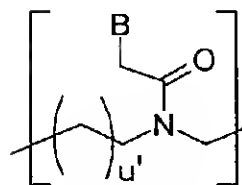
Formel IV C



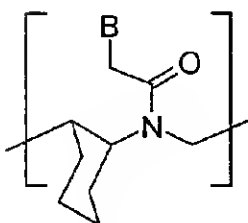
Formel IV D



Formel IV E



Formel IV F



Formel IV G

wobei jeder Baustein {BLOCK} verschieden sein kann,

und wobei ferner gilt, dass

5

$z'$  gleich 0 bis 100 ist, vorzugsweise 1-20, besonders bevorzugt 4-15

10

A unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_1R_2)_s$  ist, wobei s gleich 1 bis 3 ist, vorzugsweise 1,

B unabhängig voneinander entweder ein aromatischer Rest, der auch heteroaromatischen Charakter besitzen kann, oder Wasserstoff, oder Hydroxy oder  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl ist,

oder eine in der Nucleotidchemie übliche natürlich vorkommende  
 oder eine nicht natürlich vorkommende Nucleobase oder deren  
 Prodrugform ist,  
 wobei mindestens ein Rest B eine Nucleobase ist,

5

D unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_3R_4)_t$  ist, wobei t gleich  
 2 bis 10 ist, vorzugsweise 2 bis 4, besonders bevorzugt 2,  
 wobei zwei benachbarte Reste  $R_3$  und  $R_4$  auch einen C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>-  
 Cycloalkylring bilden können,

10

E unabhängig voneinander eine Gruppe  $(CR_5R_6)_u$  ist, wobei zwei  
 benachbarten Reste  $R_5$  und  $R_6$  auch einen C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkyl-  
 Ring oder eine Spiroverbindung bilden können.

15

$R_5$  und  $R_6$  unabhängig voneinander einen Rest bestehend aus  
 Wasserstoff oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl sind, vorzugsweise  
 Wasserstoff, oder eine Aminosäure-Seitenkette sind.

sowie physiologisch verträglichen Salze des PNA-Derivates der Formel I,

20

mit der Maßgabe, dass mindestens ein Rest Y oder Z gleich Hydroxy,  
 Mercapto, Oxyanion oder Thioat ist.

25

2. PNA-Derivat nach Anspruch 1, wobei mindestens ein Rest Y oder Z in  
 Formel I in einem pH-Bereich von 4,5 bis 14, vorzugsweise 6,5 bis 12,  
 besonders bevorzugt 6,5 bis 9 gleich Oxyanion oder Thioat ist.

3. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei D gleich  $(CH_2)_2$   
 ist.

30

4. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei A und E gleich  $\dot{\text{C}}\text{H}_2$  sind.
5. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei Q gleich ein Hydroxyaminoalkyl-Rest ist, bevorzugt ein Hydroxyaminohexyl-Rest, oder gleich einer Carriersequenz ist, bevorzugt Transportan, Insulin-like Growth Factor, Nuclear Localisation Signale, oder ein Affinitäts-Tag ist, bevorzugt eine (His)<sub>6</sub> Kette.
- 10 6. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei B gleich Adenin, Cytosin, 5-Methylcytosin, Guanin, Thymin und Uracil, oder gleich Purin, 2,6-Diaminopurin, N<sup>4</sup>N<sup>4</sup>-Ethanocytosin, N<sup>6</sup>N<sup>6</sup>-Ethano-2,6-diaminopurin, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-uracil, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin, 5-(1-Propargylamino)-uracil, 5-(1-Propargylamino)-cytosin, Phenoxazin, 9-  
15 Aminoethoxyphenoxazin, 5-Fluor-uracil oder Pseudoisocytosin, 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, 8-Azapurin, oder ein 7-  
20 Deaza-7-substituiertes Purin ist.
7. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei W gleich Sauerstoff, und Y gleich Hydroxy oder Oxyanion sind.
- 25 8. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei X gleich eine Gruppe U-(C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>-AlkandiyI)-U, bevorzugt O-(C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>-AlkandiyI)-O, besonders bevorzugt O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-6</sub>O ist, oder gleich eine Gruppe U-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>u'</sub>, bevorzugt O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>u'</sub>, besonders bevorzugt O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>u'</sub>, wobei u' bevorzugt 1 bis 6 ist.

9. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei Z gleich Phosphat oder ein C<sub>1</sub>- bis C<sub>22</sub>-Rest ist, oder ein C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-U-Rest, bevorzugt ein C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkoxy-Rest, besonders bevorzugt C<sub>16</sub>-Alkoxy, oder Hydroxy-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-U, bevorzugt Hydroxy-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-O, besonders
- 5 bevorzugt HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3-12</sub>O, oder ein Aminoalkyl-U-Rest, bevorzugt ein Aminoalkoxy-Rest, besonders bevorzugt 6-Aminohexoxy oder 5-Aminopentoxy, oder eine Gruppe der Formel R<sub>9</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub> ist, wobei R<sub>9</sub> bevorzugt OH oder NH<sub>2</sub> ist und m gleich 1 bis 6 ist, besonders bevorzugt HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>2</sub>, HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>6</sub> und H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sub>2</sub>, oder ein
- 10 Mercaptoalkyl-U-Rest, bevorzugt ein Mercaptoalkoxy-Rest, besonders bevorzugt 6-Mercaptohexyloxy.
10. PNA-Derivat nach Anspruch 1 bis 7, wobei X und Z unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe Biotin-, Fluorescein- oder Lexitropsin-Derivat ist.
- 15
11. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei X und Z unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe Rhodamin, TAMRA oder Cyanin-Farbstoff.
- 20
12. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei X und Z unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe Dabcyl, Psoralen, Acridin, DNP oder Cholesterol.
- 25 13. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Basensequenz gegen Teile von Tumorsupressor-Genen, Onkogenen oder Telomerasen oder deren Transkriptions-Produkte gerichtet ist.



14. PNA-Derivat nach Anspruch 13, wobei die Basensequenz des PNA-Teils gegen den Translationsstart von HA-ras mRNA gerichtet ist.
- 5 15. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Verwendung als Arzneimittel.
16. Verwendung eines PNA-Derivates nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Tumorthherapie.
- 10 17. PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Verwendung als Diagnostikum.
18. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zum Nachweis von Mikroorganismen und/oder Viren.
- 15 19. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zum Nachweis und/oder Quantifizierung von Nukleinsäuren.
- 20 20. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 14 als Nachweisreagenz für die in-situ- oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.
- 25 21. Verwendung eines PNA-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 14 als Antisense-, Anti-Gen-, Decoy-, oder Chimperaplast-Agenz.
22. Nachweisreagenz enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 14.
- 30 23. PNA-Chip, enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 14.

24. Biosensor enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 14.
- 5 25. Arzneimittel, enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 14 und gegebenenfalls weitere pharmakologisch verträgliche Zusatz- und/oder Trägerstoffe.
- 10 26. Antisense-Agenz, enthaltend ein PNA-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 14.
27. Verfahren zur Herstellung eines PNA-Derivates nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei
- 15 a) das PNA-Rückgrat vom C-Terminus ausgehend mittels aktivierter Amidnukleinsäuren aufgebaut wird, und
- b) am N-Terminus mit einem Phosphorylierungsreagenz umgesetzt wird.
28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die PNA unter Verwendung der Schutzgruppen t-Butyloxycarbonyl (BOC), 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) oder Monomethoxytrityl (Mmt) hergestellt wird.
- 20 29. Verfahren nach Anspruch 28; wobei die PNA unter Verwendung von festen Trägern hergestellt wird.
- 25 30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei als fester Träger CPG, Tentagel oder Aminomethylpolystyren verwendet wird.
31. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei
- 30 a) ein PNA-Derivat gemäß einem der Ansprüche 27 bis 30 hergestellt wird, und

b) gegebenenfalls mit weiteren pharmakologisch verträglichen Zusatz- und/oder Trägerstoffen versetzt wird.

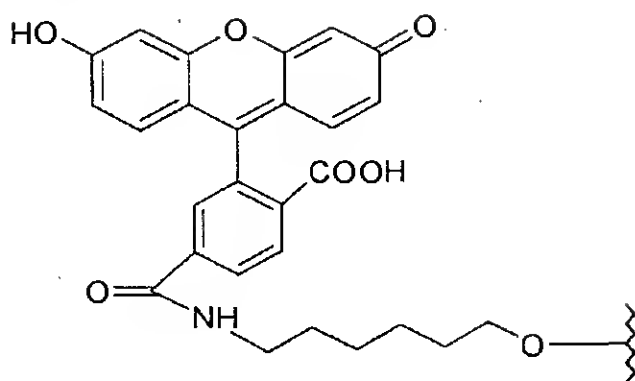
- 5 32. Verfahren zur Herstellung eines PNA-Chips, wobei gemäß einem der Ansprüche 27 bis 30 entweder zuerst ein PNA-Derivat hergestellt und dann auf einem festen Träger fixiert wird, oder das PNA-Derivat direkt auf dem Träger hergestellt wird.
- 10 33. Verfahren zur Herstellung eines PNA-Derivats der Formel I gemäß Anspruch 27 bis 30, ferner dadurch gekennzeichnet, dass die PNA unter Ausnutzung des sauren Charakters des Phosphorrestes mittels Chromatographie oder Elektrophorese aufgereinigt wird.
- 15 34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei ein PNA-Derivat durch Chromatographie mittels einer basischen stationären Phase und einem sauren oder salzhaltigen Eluent gereinigt werden.
35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei die stationäre Phase ein Anionenaustauscher oder eine Mixed-Mode-Phase ist.

Zusammenfassung:

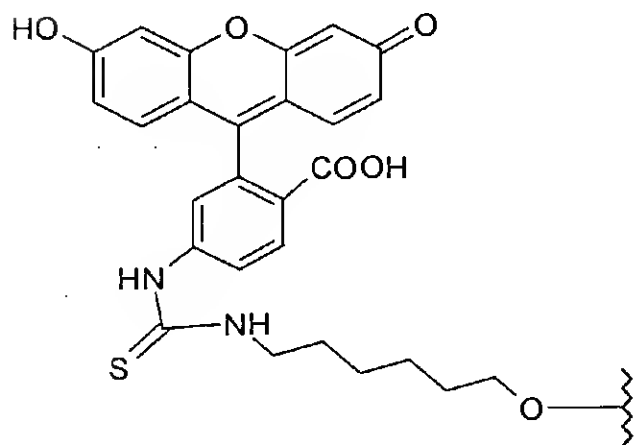
AVE D-2000/A 022

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind PNA-Derivate, die am N-Terminus des PNA-Rückgrates einen Phosphoryl-Rest tragen, beispielsweise einen
- 5 Phosphat- oder einen substituierten Phosphorylrest, wobei substituierte Phosphorylderivate gegebenenfalls eine oder mehrere Markergruppen, oder Gruppen zur Quervernetzung, oder Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, oder Gruppen, die die Bindungsaffinität des PNA-Derivats an
- 10 Verfahren zur Herstellung der oben genannten PNA-Derivate und ihre Anwendung als Arzneimittel und Diagnostikum.

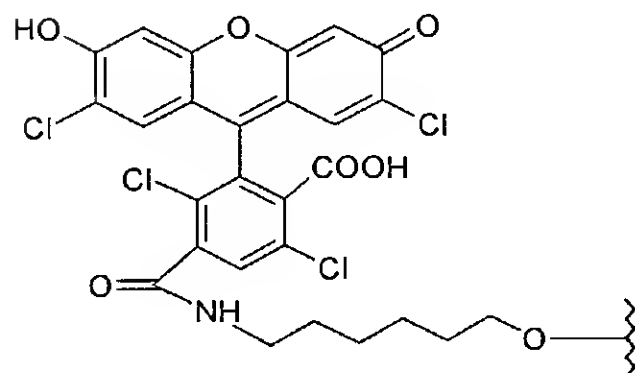
Figur 1a:



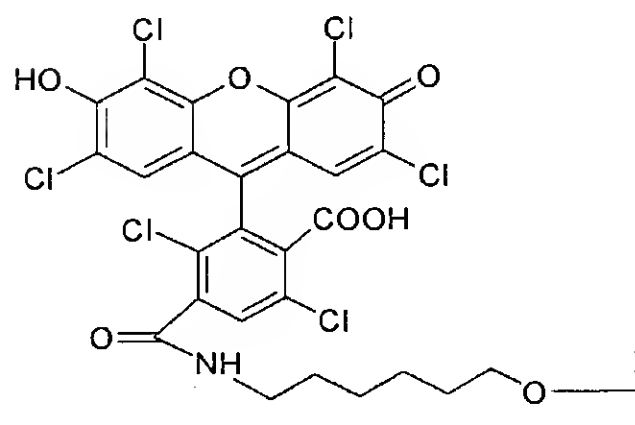
Fluorescein (Amid)



Fluorescein (Thioharnstoff)

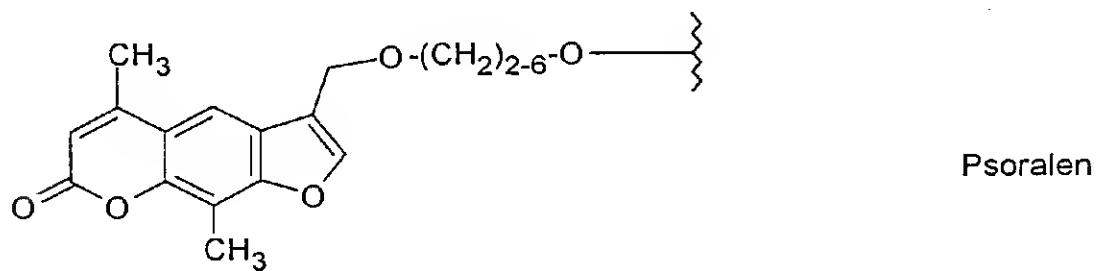
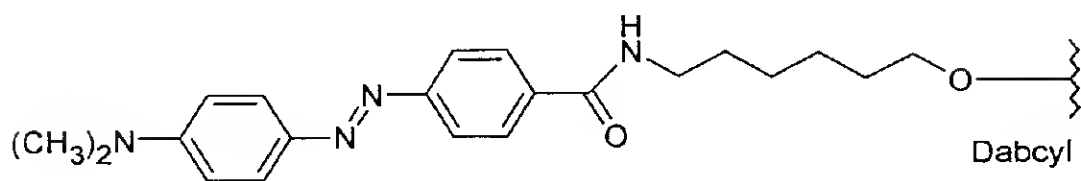
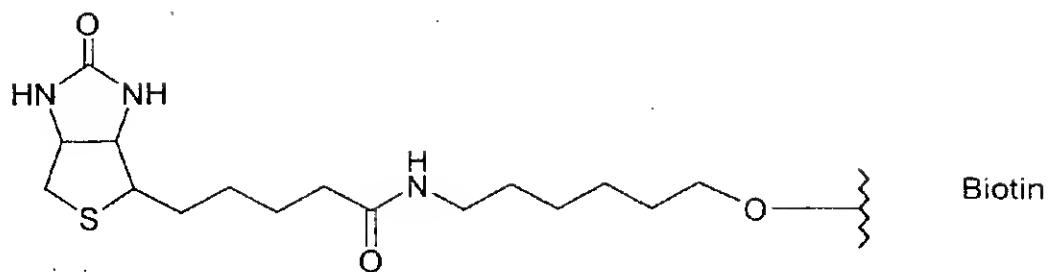


Tetrachlorofluorescein

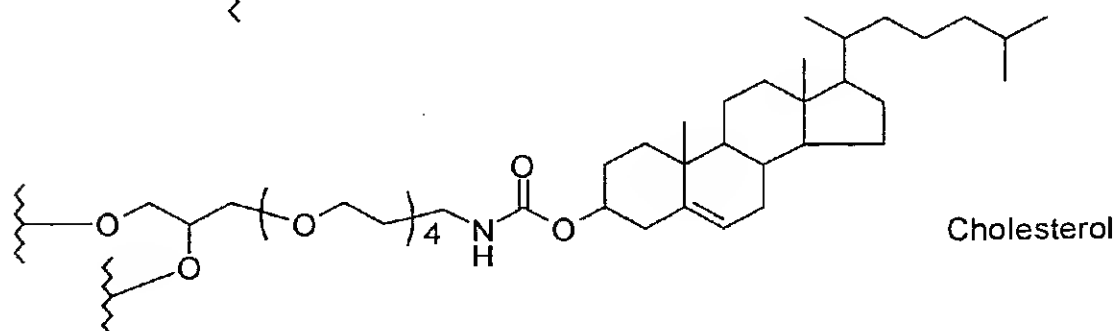
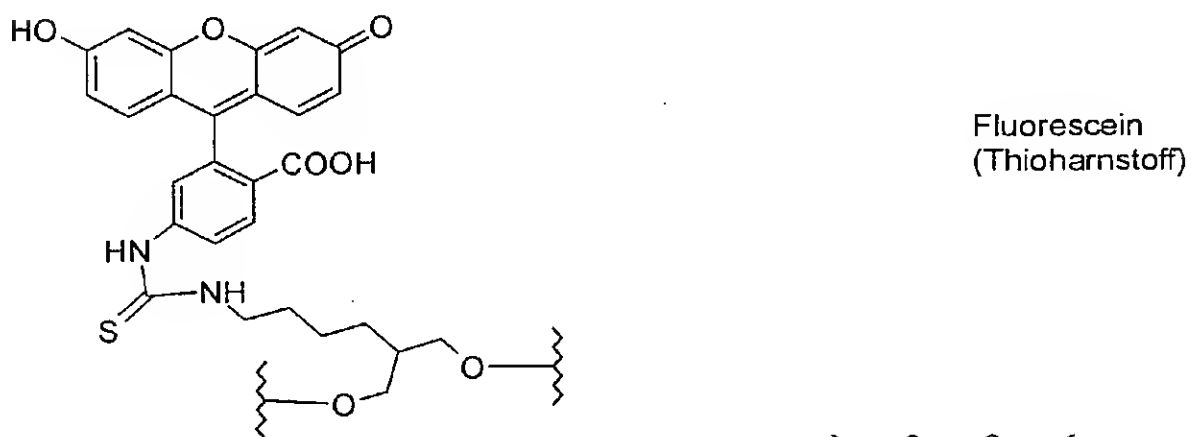
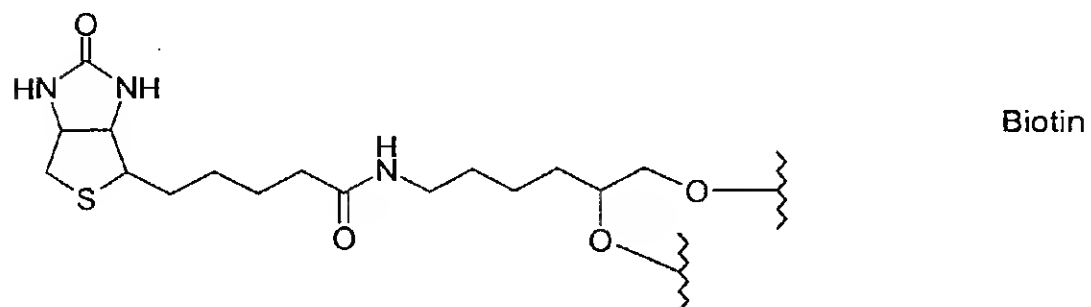
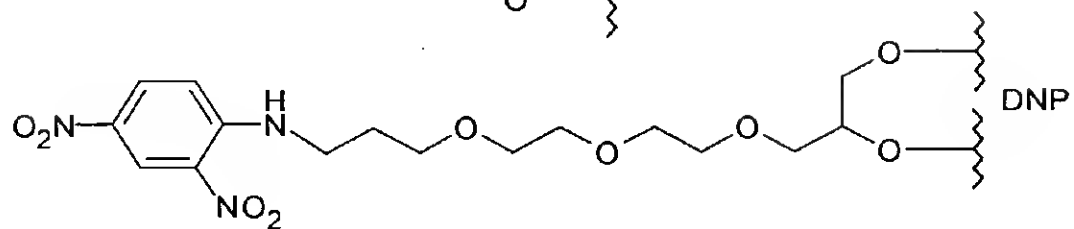
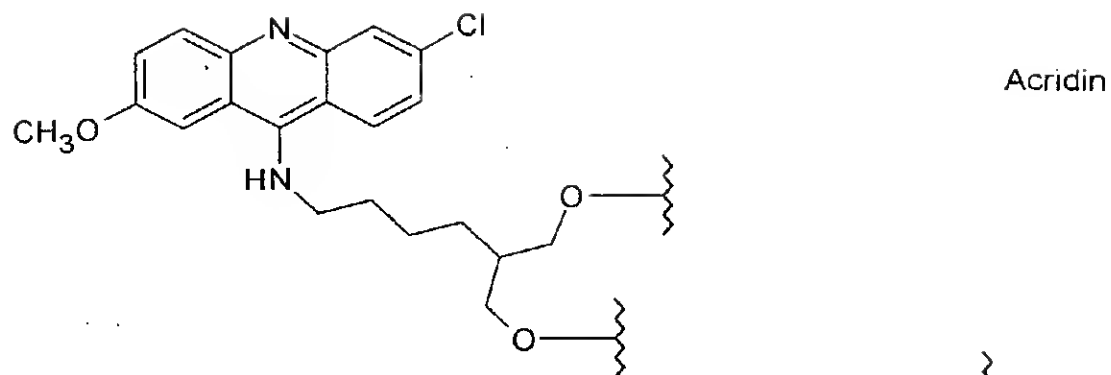


Hexachlorofluorescein

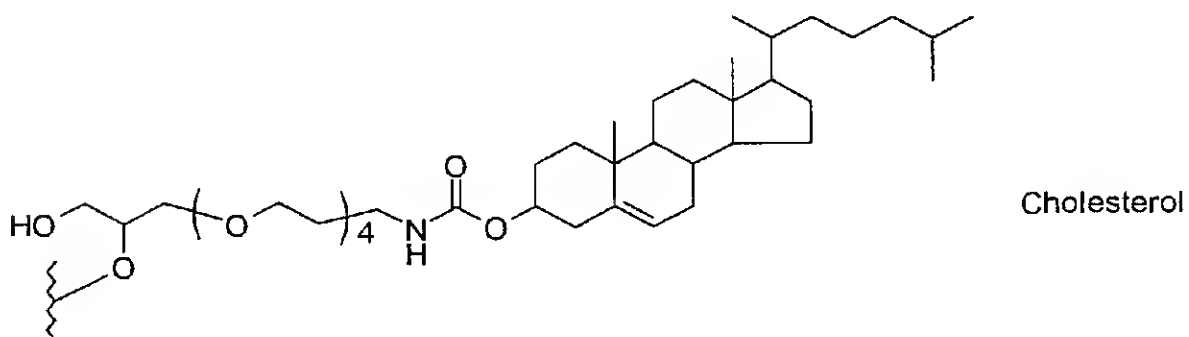
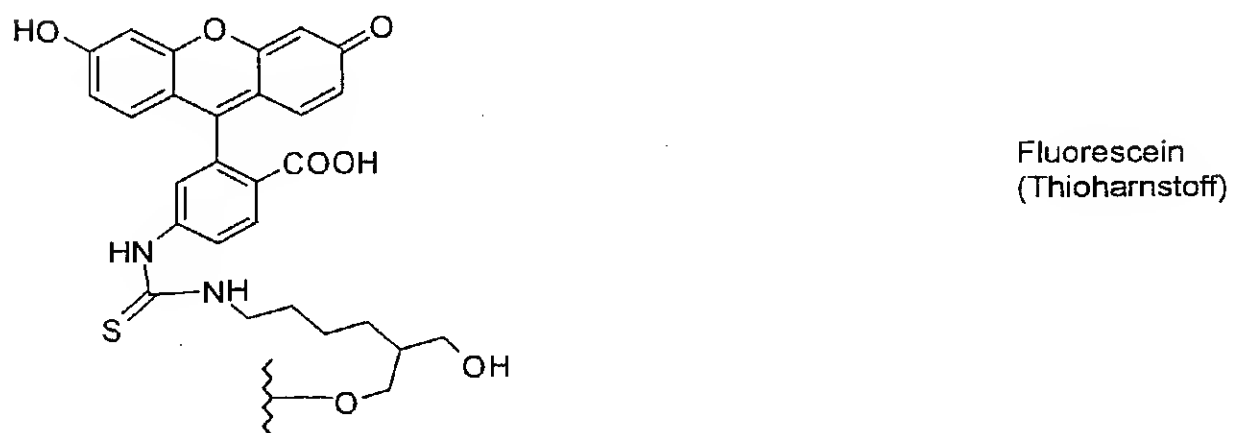
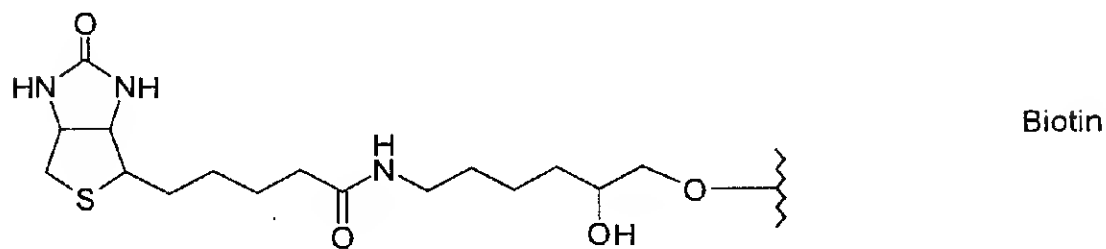
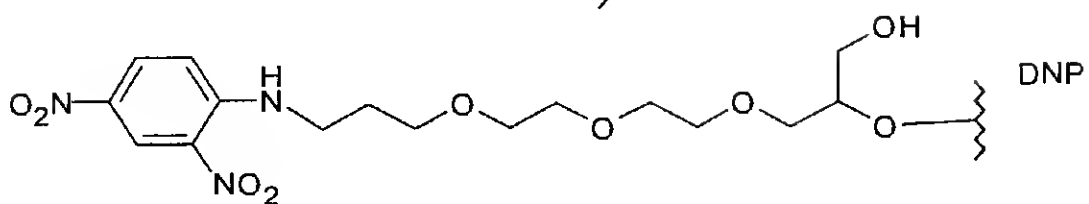
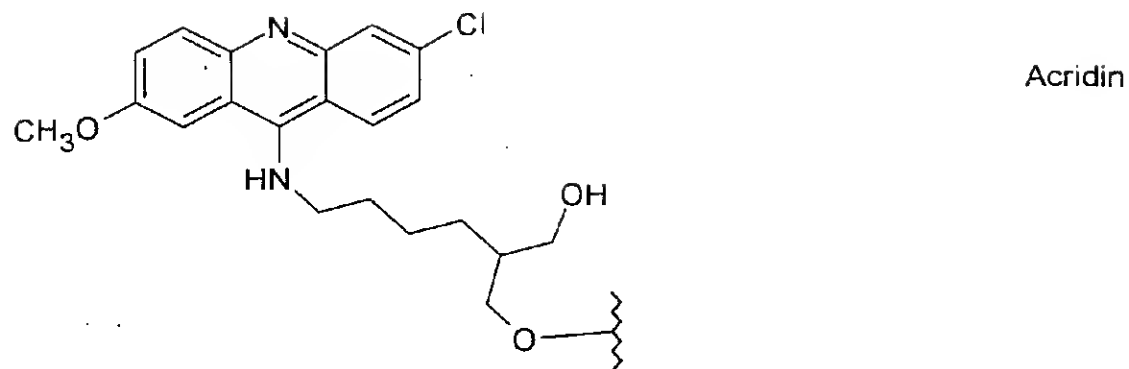
Figur 1b:



Figur 2a:

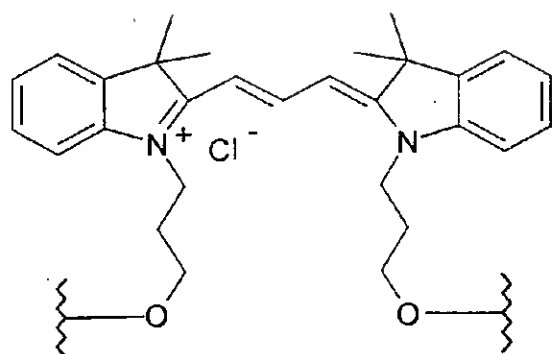


Figur 2b:

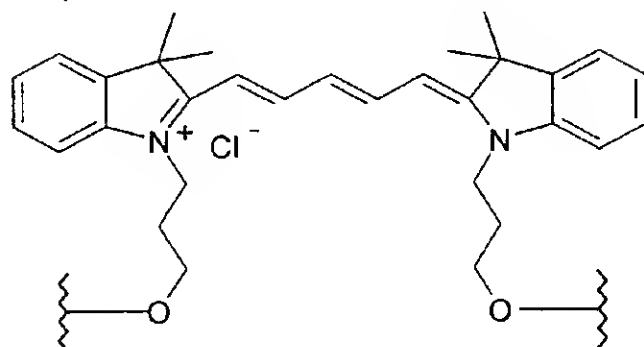




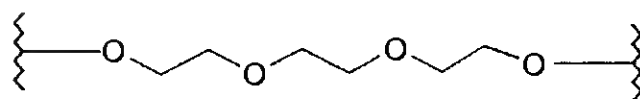
Figur 3a:



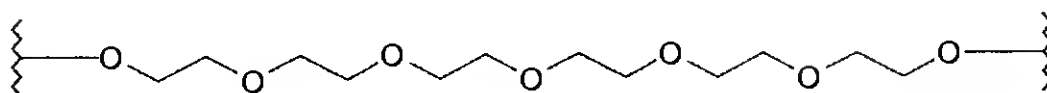
Cy3



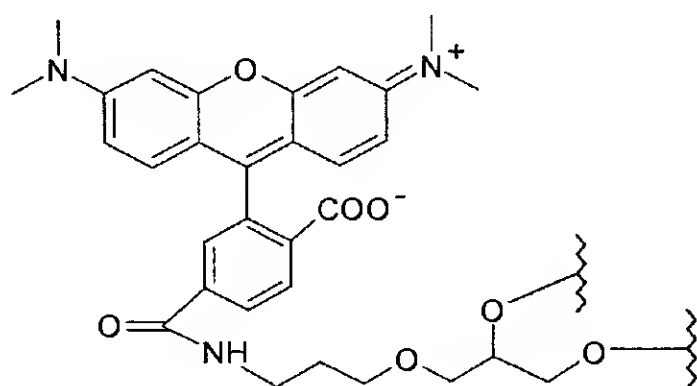
Cy5



Spacer-9

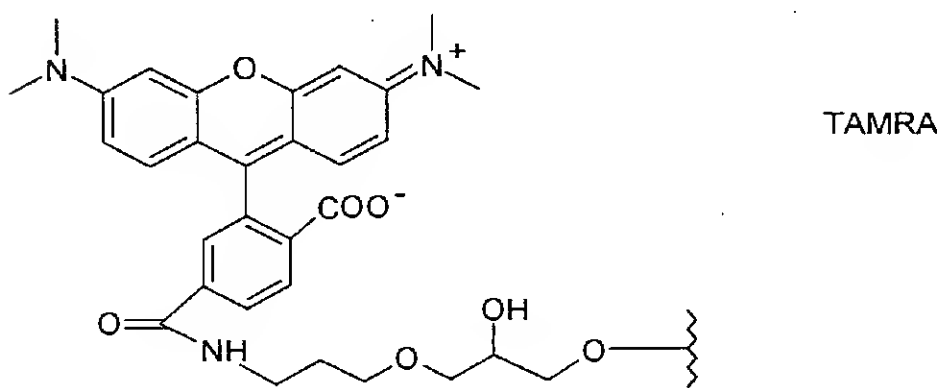
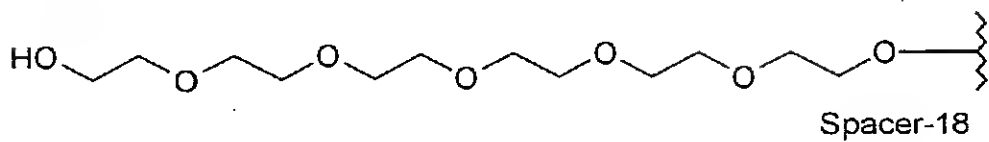
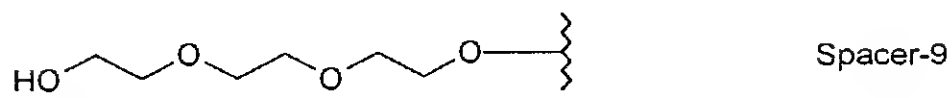
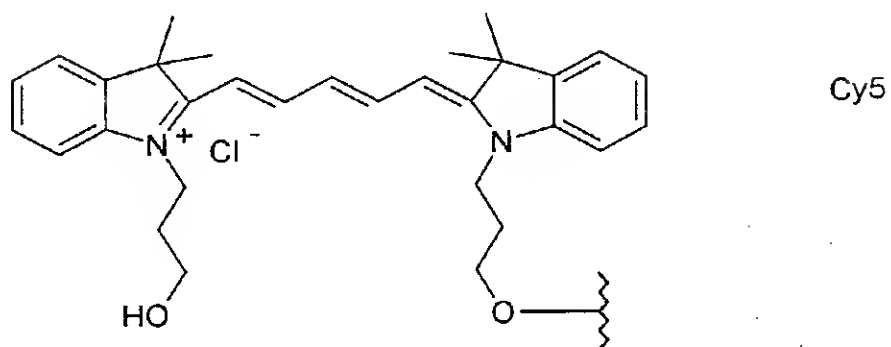
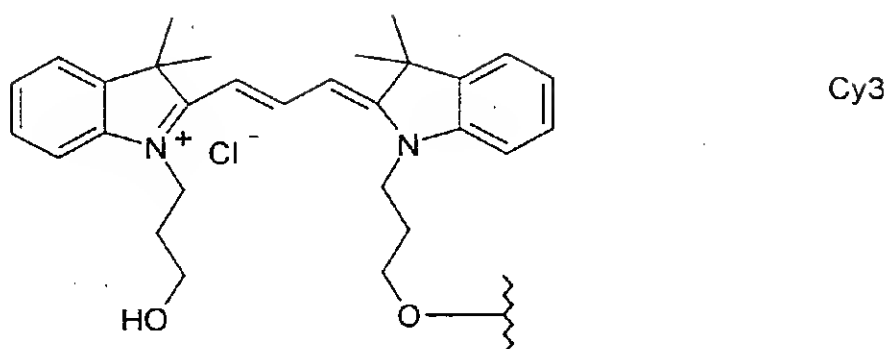


Spacer-18

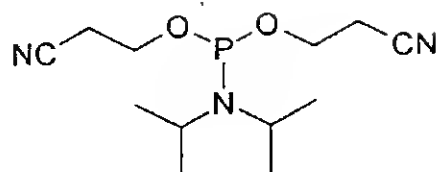


TAMRA

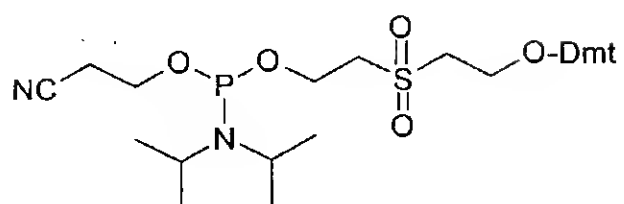
Figur 3b:



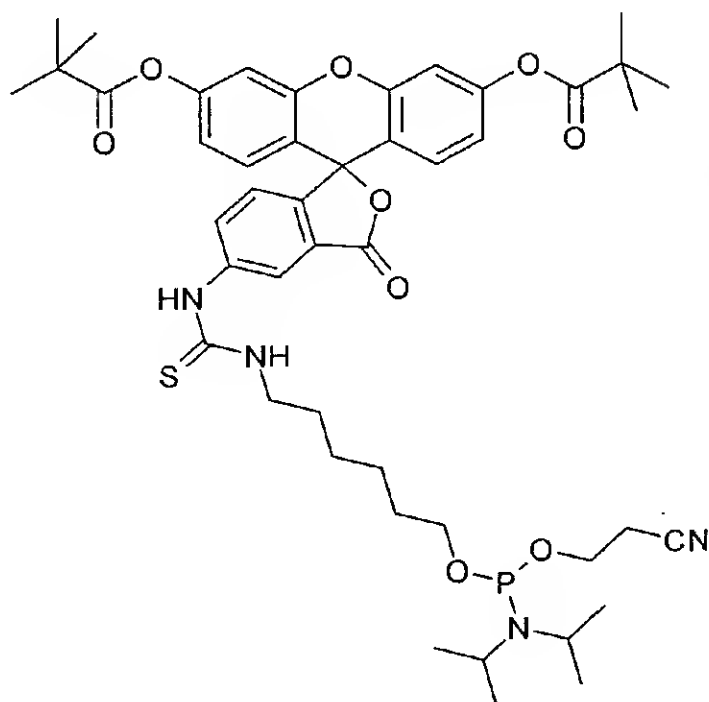
Figur 4a:



Phosphorylierungsreagenz 1

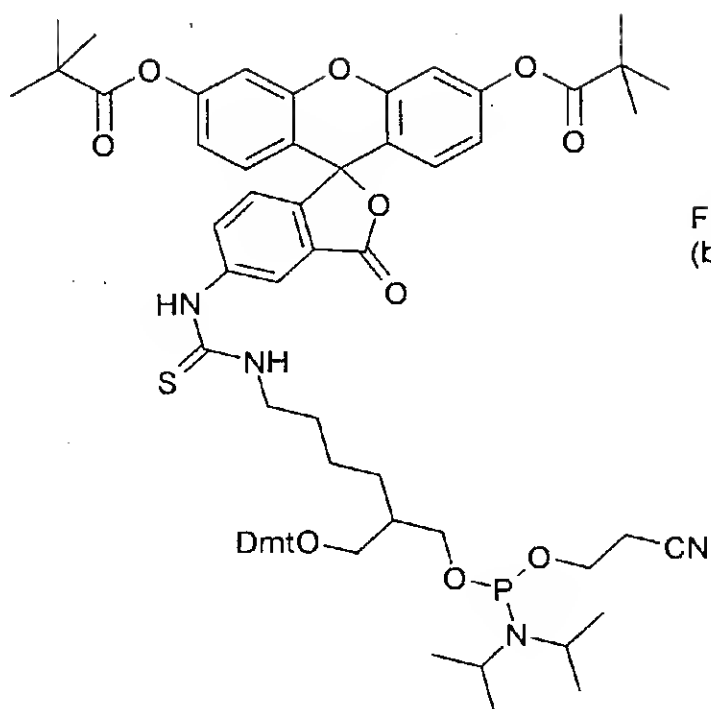


Phosphorylierungsreagenz 2

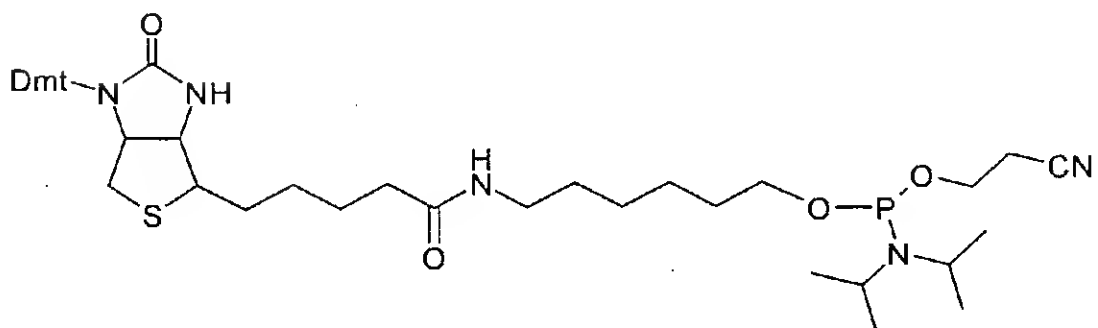


Fluorescein Phosphoramidit 3  
(monofunktionell)

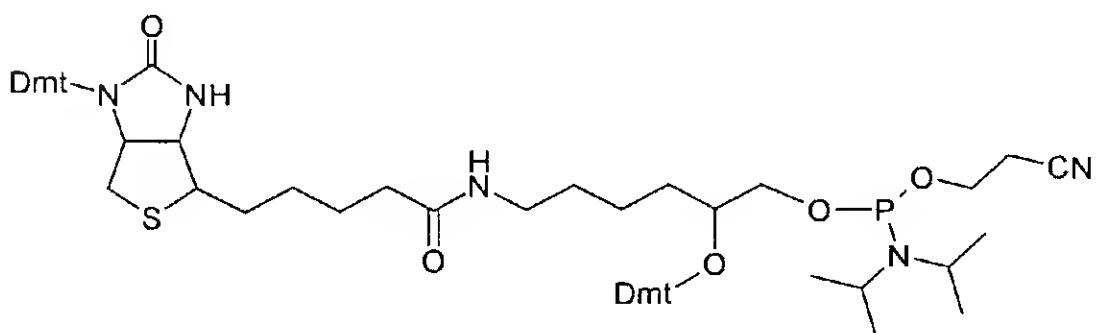
Figur 4b:



Fluorescein Phosphoramidit 4  
(bifunktionell)

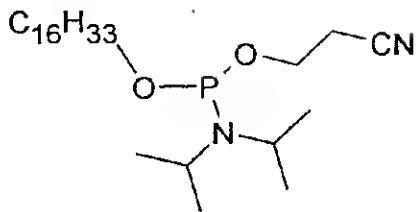


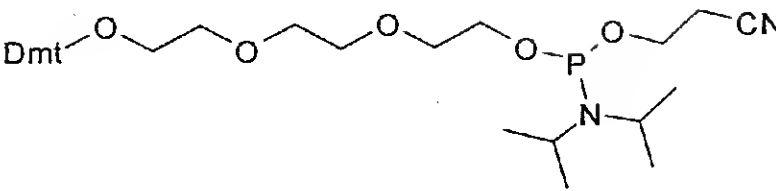
Biotin Phosphoramidit 5 (monofunktionell)

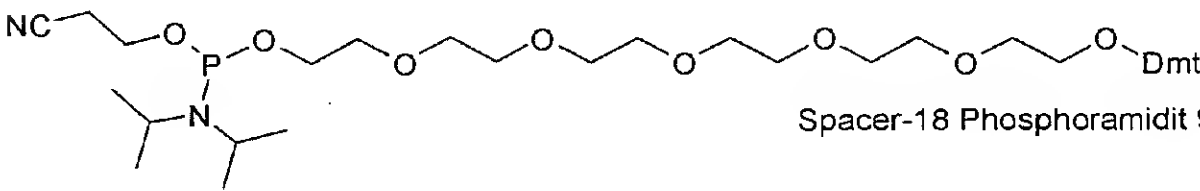


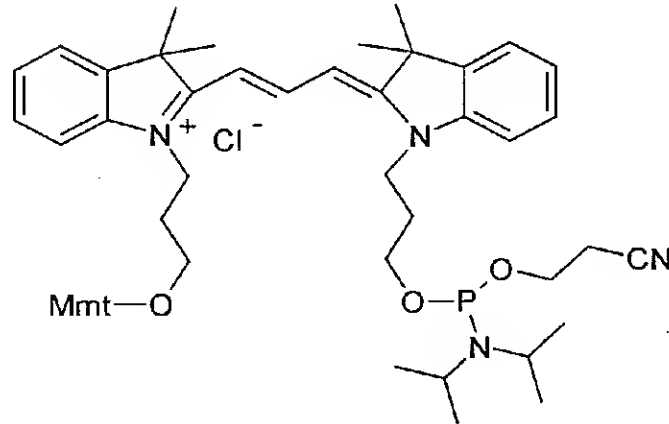
Biotin Phosphoramidit 6 (bifunktionell)

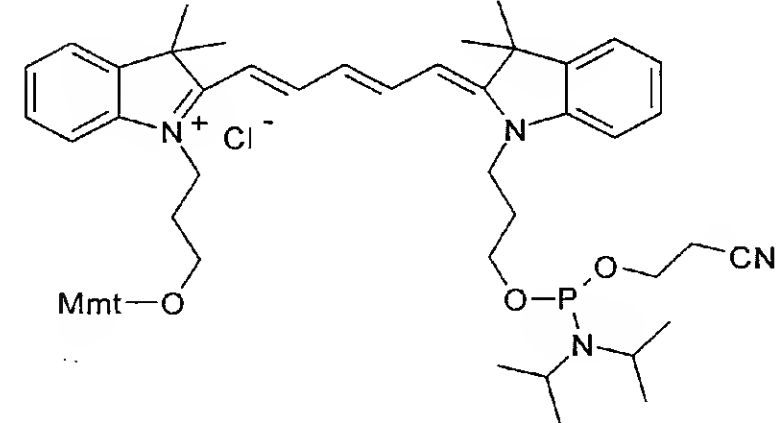
Figur 4c:

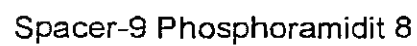
 C16-Phosphorylierungsreagenz 7

 Spacer-9 Phosphoramidit 8

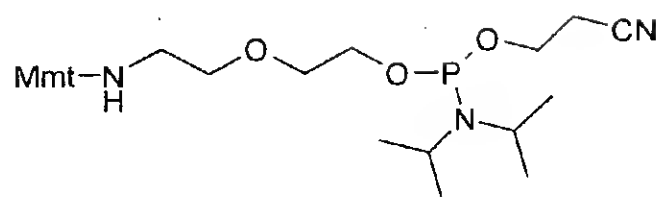
 Spacer-18 Phosphoramidit 9

 Cyanin-3 Phosphoramidit 10

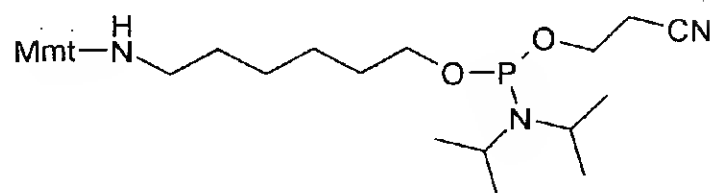
 Cyanin-5 Phosphoramidit 11



Figur 4d:

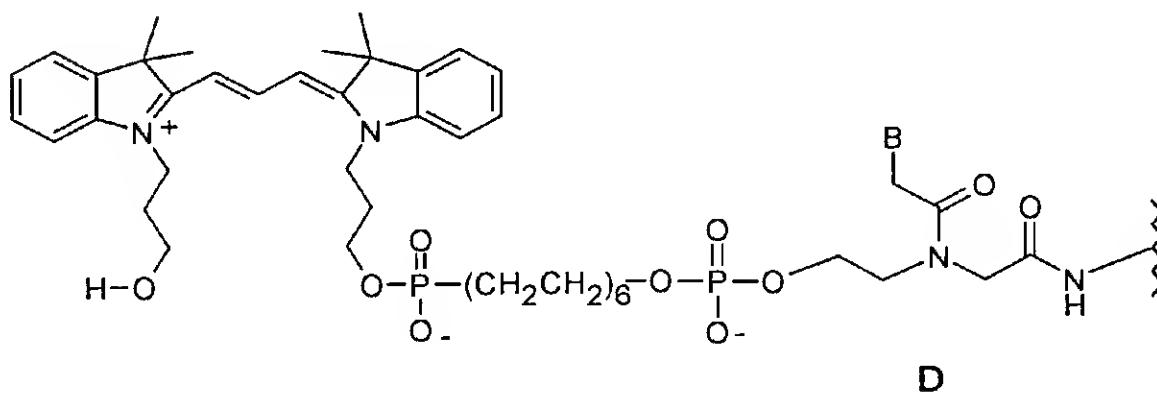
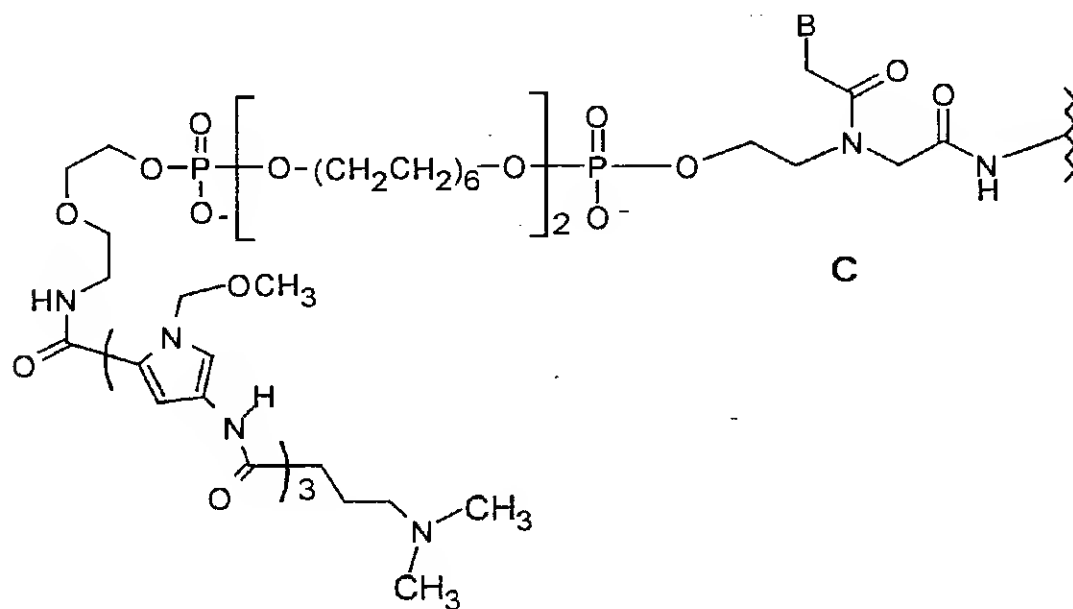
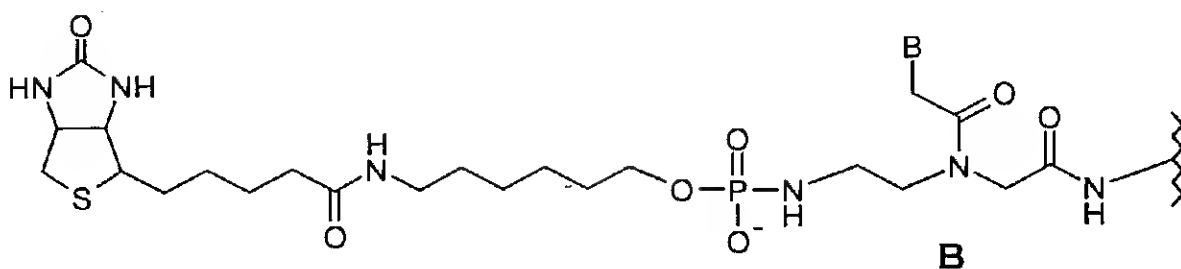
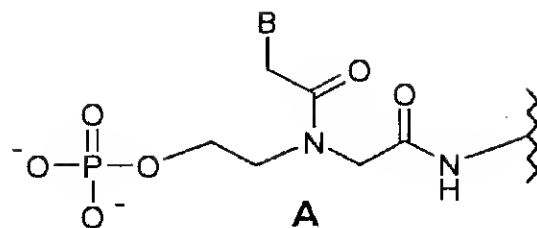


Aminomodifier-5  
Phosphoramidit 12



Aminomodifier-C6  
Phosphoramidit 13

Figur 5a:



Figur 5b:

